



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

체육학석사 학위논문

쥐의 뒷다리 부유 후
저항성 사다리 운동이 근육에 따라
근회복과 Heat Shock Protein 72
발현에 미치는 영향

The Effect of Resistance Ladder Climbing
Exercise on Muscle Recovery
and Heat Shock Protein 72 Expression
after Hindlimb Unloading in Rat

2018년 2월

서울대학교 대학원

체 육 교 육 과

김 호 연

쥐의 뒷다리 부유 후
저항성 사다리 운동이 근육에 따라
근회복과 Heat Shock Protein 72
발현에 미치는 영향

지도교수 송 욱

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2017년 12월

서울대학교 대학원

체육교육과

김 호 연

김호연의 석사 학위논문을 인준함

2017년 12월

위 원 장 _____ 이 용 호 (인)

부위원장 _____ 문 효 열 (인)

위 원 _____ 송 욱 (인)

초 록

골격근의 활동이 제한되어 근위축(Atrophy)이 유발될 경우 효과적으로 회복을 하는 것이 중요하므로 이와 관련된 방법과 물질들이 계속해서 연구되고 있다. 쥐의 뒷다리 부유(Hindlimb unloading)는 근육의 불용으로 인해 사람에게 나타나는 근위축을 재현하는 모델이다. 반면 저항성 사다리 운동은 단기간의 트레이닝으로 근위축에 대항하여 근비대(Hypertrophy)를 유발하는 가장 효과적인 방법이다. 따라서 본 연구에서는 Sprague-Dawley rat을 대상으로 2주간의 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유발하고, 4주간의 중력재부하와 저항성운동을 실시하여 근육별로 근육의 회복 정도와 HSP72의 발현량을 비교하였다.

9주령의 수컷 Sprague-Dawley rat을 대상으로 대조군(CON)과 뒷다리 부유 후 중력재부하(HRE) 그룹, 뒷다리 부유 후 저항성 사다리운동(HEX) 그룹으로 나누어 각 그룹 당 7마리씩 배정하였다. 근위축을 유발하기 위해 2주간 뒷다리부유를 실시하였다. 그 후 회복효과를 근섬유 형태별로 확인하기 위해 중력재부하(Reloading)와 저항성 사다리 운동을 4주간 실시하여 가자미근(Soleus)과 비복근(Gastrocnemius)을 분석하였다. 표현형 분석을 위해 근육 무게(Wet weight)를 측정하고 Troponin I-SS, Troponin I-FS, 근위축 관련인자(Atrogin-1, Murf-1), 염증관련인자(TNF- α , IL-6), HSP72의 mRNA와 단백질 발현량을 각각 Real-time PCR과 western blot을 통해 분석하였다. 본 연구의 자료는 SPSS 22.0 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 기술통계를 통해 각 항목별 평균과 표준오차를 구하고 집단 간 차이의 검증은 Independent t-test와 one-way ANOVA를 실시하였다. 모든 통계의 유의 수준은 $P < .05$ 로 설정하였다.

2주간의 뒷다리 부유를 실시한 결과 가자미근과 비복근의 근 무게가 유의하게 감소하였다. 4주간 저항성 사다리 운동을 실시한 그룹의 Grip strength가 두 그룹의 비해 유의하게 증가하였다. 가자미근과

비복근에서 Troponin I-SS와 Troponin I-FS 단백질을 분석한 결과 가자미근의 HRE 그룹에서만 Troponin I-FS가 유의하게 증가 되었다. 가자미근의 Atrogin-1 mRNA level은 HRE, HEX그룹이 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였고 TNF- α 는 HRE그룹에서, IL-6는 HEX그룹에서만 유의하게 증가하였다. 비복근의 Atrogin-1과 Murf-1의 mRNA 발현량은 중재 그룹 모두 CON 그룹에 비하여 유의하게 감소하였다. HSP72의 단백질 발현량은 가자미근에서 HRE, HEX 그룹 모두 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였다.

중력재부하와 저항성 사다리 운동이 근육에 회복에 있어서 긍정적인 효과를 나타냈지만 분자수준에서 중재 간에 큰 차이가 나타나지 않았으므로 근회복과 HSP72 발현량의 차이를 확인하기 위해 추후 연구에서 기전 연구와 함께 적절한 중재기간을 적용하여 연구될 필요가 있다.

주요어 : 뒷다리 부유, 근위축, 중력재부하, 저항성 운동, 근회복, HSP72
학 번 : 2016-21623

목 차

I. 서 론	1
1. 연구의 필요성	1
2. 연구의 목적	4
3. 연구의 가설	4
II. 이론적 배경	5
1. 쥐의 뒷다리 부유 모델	5
2. 저항성 사다리 운동	8
3. Heat shock protein	9
III. 연구 방법	11
1. 실험동물	11
2. 연구 설계	12
3. 뒷다리 부유 처치 프로토콜	14
4. 운동 프로토콜	15
5. Grip strength 측정	16
6. 조직 적출	17
7. Real-time PCR	18
8. 단백질 추출 및 정량	19
9. SDS-PAGE	20
10. Western blot	21
11. 자료처리	22

IV. 연구 결과	23
1. 2주간의 뒷다리 부유 후 근육별 무게변화	23
2. 4주간의 중재 후 근육별 무게 변화	24
3. Grip strength	25
4. 4주간의 중재 후 근육별 근섬유 형태 변화	27
5. 근위축 및 염증 관련 인자의 mRNA발현량	29
6. HSP72 발현량	31
 V. 논 의	 33
 참고문헌	 38
Abstract	53

표 목 차

Table 1. Research group	11
Table 2. Exercise protocol	15
Table 3. Primer sequence	18
Table 4. Grip strength	26

그 림 목 차

Figure 1. Research design	13
Figure 2. Changes in muscle weight after 2 weeks hindlimb unloading	23
Figure 3. Changes in muscle weight after 2 weeks unloading and during 4 weeks reloading, 4 weeks resistance exercise	24
Figure 4. Changes in hindlimb grip strength	25
Figure 5. Expression of Troponin protein isoforms	28
Figure 6. Expression of atrophy and inflammation relative markers mRNA level	30
Figure 7. Expression of HSP72 protein and mRNA	32

I. 서론

1. 연구의 필요성

골격근량의 유지와 증대는 인간의 건강한 삶을 위해 매우 중요하다. 이러한 골격근 양을 효과적으로 유지하기 위해 골격근 세포의 성장과 합성을 위한 운동요법이나 식이요법 등 다양한 방법이 연구되고 있다(Goldberg, 1968, Vandeburgh & Kaufman, 1979, Baldwin, Valdez, Herrick, MacIntosh, & Roy, 1982, Esser, 2008). 우주 비행으로 인해 무중력 환경에 있는 우주비행사나 부상 또는 투병으로 인한 장기간의 침상생활로 골격근의 활동이 제한되는 환자의 경우 감소된 활동량으로 인해 근육의 무게가 손실되고 근력이 약화 된다(Armstrong, Warren, & Warren, 1991; Widrick et al., 1999). 근기능의 저하는 자세유지, 호흡 등 생체 활동의 기본적인 항상성을 떨어뜨리고 부상과 질병 상황에 노출되기 쉽게 한다. 따라서 활동의 제한으로 인한 골격근의 형태학적, 생리학적 변화에 대해 많은 연구가 진행되고 있으며 부상을 최소화 하면서 효과적으로 회복, 재생, 재활을 위한 이론적 방법들이 연구되고 있다(Appell, Duarte, & Soares, 1990).

근위축은 단백질 분해(Degradation) 비율을 증가시키고 단백질 합성(Synthesis)을 감소시킴으로서 손상된 골격근의 재생능력이 저하되는 것을 말한다(Naito, Powers, Demirel, & Aoki, 2001; Aragno et al., 2004). 운동은 이러한 문제를 해결하기 위한 효과적인 방법으로 알려져 있다. 운동을 통해 골격근 섬유에서 근위축 인자를 방어하고 근섬유의 성장 및 비대를 유도하는 관련 인자들을 활성화 시킬 수 있다(Seward, Haney, Rudnicki, & Swoap, 2001; Talmadge, 2000).

쥐의 뒷다리 부유 모델은 우주비행사나 침상생활 환자에게 나타나는 근육량 감소, 근섬유의 크기 감소, 근력 감소 등의 근위축 현상을

유사하게 유발할 수 있어 널리 사용되는 방법이다(Akima et al., 2000; Rittweger et al., 2005; Zange et al., 1997; Yamashita-Goto et al., 2001; Morey-Holton & Wronski, 1982; Musacchia & Fagette, 1997; Hanson, Stodieck, Cannon, Simske, & Ferguson, 2010). 뒷다리 부유는 쥐의 근육량과 근단면적을 감소시키고 근원섬유 단백질을 감소시키는 등 근위축을 유발한다(Vermaelen et al., 2005; Wang et al., 2006). 근위축은 근섬유 속 근핵과 위성세포 수를 감소시키고 미토콘드리아의 활성성을 저하시킨다(D. Thomason, Herrick, Surdyka, & Baldwin, 1987; Vermaelen et al., 2005; Wang et al., 2006). 또한 Atrogin-1, Murf-1과 같은 근위축 관련 인자들이 증가하는 것으로 나타났다(Maki et al., 2012). 뒷다리 부유에 의한 근위축은 특히 가자미근(Soleus)에서 큰 반응을 보이며 지근섬유(Slow twitch muscle)의 손실이 가장 크게 나타난다(Fitts, Metzger, Riley, & Unsworth, 1986, Thomason, Herrick, Surdyka, & Baldwin, 1987, D. B. Thomason & Booth, 1990).

저하된 근 기능과 골격근의 손실을 효과적으로 회복, 재생을 위해서는 운동요법이 가장 효과적이라고 알려져 있다(Bodine et al., 2001). 점증적 부하의 저항성 운동은 근비대를 일으키고 근위축을 감소시켜 신체적 능력을 향상시킬 수 있다. 단기간의 운동으로도 그 효과를 확인할 수 있으며 사람과 동물연구에서 모두 그 효과를 검증하였다(Adams, Cheng, Haddad, & Baldwin, 2004; Fry, 2004; Hather, Tesch, Buchanan, & Dudley, 1991; Tesch, Ekberg, Lindquist, & Trieschmann, 2004). 쥐를 대상으로 저항성 운동을 재현하기 위해 1980년대에 사다리 운동이 디자인 되었다(Herbert, Roy, & Edgerton, 1988). 사다리 운동을 통한 근비대와 근력 증가의 효과가 확인 되어 많은 기전 연구가 선행되었다(Herbert, Roy, & Edgerton, 1988; Jung et al., 2015; Herbert, Roy, & Edgerton, 1988; Hornberger Jr & Farrar, 2004). 저항성 운동은 근섬유 지름 증가, 근력 증가 등 근단백질 재합성으로 인한 근비대를 유발하므로 근위축으로 인해 발생하는 근손실을 효과적으로 보호 할 수 있다(Jung et al., 2015; Herbert, Roy, & Edgerton, 1988; Hornberger Jr

& Farrar, 2004).

운동은 근수축을 통해 이루어지므로 이에 대한 반응으로 열을 발생시킨다. 이러한 스트레스에 대항하여 골격근에서는 HSP72 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다(Snoeckx, Cornelussen, Van Nieuwenhoven, Reneman, & Van der Vusse, 2001; Murlasits et al., 2006; Locke, Noble, & Atkinson, 1990; Salo, Donovan, & Davies, 1991). 선행연구 결과에 따르면 HSP72가 근육의 상해와 근위축으로부터 방어적 역할을 한다고 보고되고 있다. 유전자 변형을 통해 HSP72를 과발현 시킨 쥐는 근육의 손상 후 근력의 감소가 더 적게 나타났으며 이러한 결과는 회복을 더 빠르게 할 것이라고 기대할 수 있다(McArdle, Dillmann, Mestril, Faulkner, & Jackson, 2004). 하지만 근위축으로부터 보호적으로 대응되는 기전과 근육 내 HSP72의 기능이 분명하게 밝혀져 있지 않으므로 보다 정확한 연구가 요구되며, 근위축에 대항하여 저항성 운동을 실시하였을 때 발현되는 HSP가 회복에 직접적인 영향을 미칠 수 있는지 연구가 필요하다.

뒷다리 부유로 인한 근위축의 생리학적 기전 연구와 뒷다리 부유 후 재부하(Reloading) 또는 유산소 운동의 처치는 연구되어 왔으나 뒷다리 부유 후 저항성 운동으로 인한 근위축 방어를 확인한 연구는 부족하다. 또한 선행 연구에서 HSP가 근육의 손상이나 근위축에 방어적인 역할을 한다는 것과 관련된 결과가 제시되고 있기 때문에 쥐의 뒷다리 부유로 골격근 손실을 유도하여 일반 처치와 운동 처치를 통해 HSP의 발현량의 변화 양상을 살펴 볼 필요가 있다.

2. 연구의 목적

본 연구의 목적은 Sprague-Dawley 쥐를 대상으로 2주간의 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유발하고, 4주간의 중력재부하와 저항성 운동을 실시하여 근섬유 형태별로 근육의 회복 정도와 HSP72 발현량을 비교하는 것이다.

3. 연구의 가설

본 연구의 목적을 규명하기 위해 다음과 같은 연구 가설을 설정하였다.

첫째, 2주간의 뒷다리 부유 후 4주간의 중력재부하와 저항성 운동 수행 후 근육의 회복과 HSP72 발현량은 그룹에 따라 차이를 나타낼 것이다.

둘째, 2주간의 뒷다리 부유 후 4주간의 중력재부하와 저항성 운동 수행 후 근육의 회복과 HSP72 발현량은 근육에 따라 차이를 나타낼 것이다.

Ⅱ. 이론적 배경

1. 쥐의 뒷다리 부유 모델

쥐의 뒷다리 부유 모델은 무중력 환경에 있는 우주비행사나 부상 또는 투병으로 장기간 침상 생활을 하는 사람들의 근육 불용(Disuse)을 재현한 모델이다. 골격근은 항상성 유지를 위해 골격근 내 활동이 증가하거나 감소하는 등 환경적 변화에 쉽게 적응하여 형태학적, 기능적으로 변화를 일으킨다. 우주비행사가 무중력 환경에 노출되거나, 골격근계 손상 또는 투병으로 오랜 침상생활을 하게 될 경우 부동(Immobilization)으로 인해 근육의 손실을 야기한다(LeBlanc et al., 2000; Grosset & Onambele Pearson, 2008; Rittweger et al., 2005; Zange et al., 1997). 8일간의 우주비행으로 무중력 환경에 노출되었을 때 근육량이 6-20% 감소되고 6개월간의 우주비행을 마치고 돌아온 경우 발바닥 굴근(Plantar flexor muscle)의 최대 근력(Maximal voluntary contraction, MVC)이 20-48% 감소된 것으로 나타났다(Akima et al., 2000; Rittweger et al., 2005; Zange et al., 1997). 이는 동물의 뒷다리 부유, 환자의 오랜 침상 생활 등의 불용(Disuse)로 인하여 나타나는 현상으로 동물과 인간 모두에게서 이와 같이 보고되고 있다(Yoshinobu Ohira et al., 2000; Y Ohira et al., 1999; Yamashita-Goto et al., 2001). 2개월, 4개월 간 병상에 오래 누워있던 환자의 경우 각각 8%, 36%의 근섬유 지름(Mean fiber diameter)이 감소된 것으로 나타났다(Yamashita-Goto et al., 2001). 이러한 근위축을 재현하기 위해 설치류에서 쥐의 뒷다리 부유 모델이 널리 사용되고 있다(Morey-Holton & Wronski, 1982; Musacchia & Fagette, 1997; Hanson, Stodieck, Cannon, Simske, & Ferguson, 2010).

쥐를 통한 뒷다리 부유는 주로 골격근량의 감소를 유발하고 근육의 기능을 저하시키는 것으로 보고되고 있다(T. Ohira et al., 2011; Leonard, Leach, & Rambaut, 1983). 이러한 현상은 단백질 분해(Degradation) 비율을 증가시키고 단백질 합성(Synthesis)을 감소시킴으로서 나타난다. 4-8일 단기간의 뒷다리 부유만으로도 근육량이 급격하게 감소하고 근섬유의 횡단면적(CSA, Cross sectional area)과 근원섬유 단백질을 감소시킨다(Vermaelen et al., 2005; Wang et al., 2006). 또한 16일간 뒷다리 부유 후 가자미근(Soleus)의 단일 근섬유 속 근핵과 위성세포가 감소하는 것을 확인하였다(D. Thomason, Herrick, Surdyka, & Baldwin, 1987; Vermaelen et al., 2005; Wang et al., 2006). 이러한 결과들을 통해 뒷다리 부유로 인한 근위축이 위성세포 수와 미토콘드리아의 활동성을 저하시켜 근육의 기능을 감소시키는 것을 알 수 있다(Wang et al., 2006; Darr & Schultz, 1989). 14일 간의 뒷다리 부유 결과 정상 쥐와 비교하여 가자미근이 25-34%가 감소된 것을 확인 하였고 근육의 횡단면적(CSA)을 관찰한 결과 지근섬유(Slow twitch muscle fibers)가 속근섬유(Fast-twitch muscle fibers)에 비해 더 크게 감소한 것을 확인하였다(Ohira et al., 1992). 뒷다리 부유에 의한 골격근 위축은 특히 지근섬유의 감소가 두드러지게 나타나며 가자미근에서 큰 감소를 나타낸다(Fitts, Metzger, Riley, & Unsworth, 1986, Thomason, Herrick, Surdyka, & Baldwin, 1987, D. B. Thomason & Booth, 1990).

환자나 우주 비행사가 근육의 불용(Disuse)으로 인한 골격근의 단백질분해(Degradation)를 방지하는 것은 일상생활로 복귀하고 지구에 돌아와 건강하게 살아가기 위해 중요한 부분이다. 유산소 운동과 저항성 운동이 오랜 침상생활로 인해 발생하는 외측광근(Vastus lateralis)과 가자미근(Soleus)의 감소를 억제하는 효과를 확인하였고, 근육과 뼈의 감소 또한 운동을 통해서 예방할 수 있다고 발표하였다(Trappe et al., 2008; Trappe, Creer, Slivka, Minchev, & Trappe, 2007; Yamashita-Goto et al., 2001). 쥐의 뒷다리 부유를 통한 근위축을

유발한 선행연구결과에서도 운동이 효과적으로 근육량의 감소를 약화시키는 것을 확인 하였으며 다양한 운동자극을 통해 근위축을 약화시키거나 방지하는 효과를 검증하고 있다(Herbert, Roy, & Edgerton, 1988; D'Aunno, Thomason, & Booth, 1990; Kirby, Ryan, & Booth, 1992; Leterme & Falempin, 1994; Hurst & Fitts, 2003; Dupont-Versteegden, Fluckey, Knox, Gaddy, & Peterson, 2006; Adams, Haddad, Bodell, Tran, & Baldwin, 2007).

2. 저항성 사다리 운동

저항성 운동은 사람과 동물 모두에게 근비대(Hypertrophy)를 효과적으로 일으킬 수 있는 운동방법으로, 단기간인 2-3주의 트레이닝 프로그램으로도 근육량과 근육의 단백질량을 증가시킬 수 있다(Adams, Cheng, Haddad, & Baldwin, 2004; Fry, 2004; Hather, Tesch, Buchanan, & Dudley, 1991; Tesch, Ekberg, Lindquist, & Trieschmann, 2004). 점증적 부하의 저항성 운동은 근비대와 더불어 근력을 증가시키고 근위축(Weakness)을 감소시켜 신체적 능력을 향상시킨다(Seo et al., 2014). 쥐의 사다리 운동은 인간의 저항성 운동을 가장 유사한 형태로 쥐에게 적용할 수 있으며 음식이나 물을 통한 보상, 결핍 없이 비교적 적은 스트레스를 통해 운동 상황을 반영 할 수 있는 장점을 가지고 있다(Seo et al., 2014).

인간의 저항성 운동을 대변하는 쥐의 사다리 운동은 1980년대에 처음 디자인 되었다. 85도 기울어진 1m가량의 사다리를 제작하였고 쥐의 몸무게의 75% 정도의 무게의 추를 꼬리에 매달아 쥐의 사다리 운동을 시행하였다(Herbert, Roy, & Edgerton, 1988). 8주간의 저항성 사다리 운동 후 대퇴사두근(Quadriceps)의 근섬유 지름이 20% 증가하였고, 7일간의 저항성 운동을 통해 가자미근(Soleus)의 힘(Force)이 증가하였다(Jung et al., 2015; Herbert, Roy, & Edgerton, 1988). 또한 8주간의 사다리 운동 결과 최대로 무게를 들 수 있는 능력이 약 2.8배 증가하였고, 장족무지굴근(Flexor Halux Longus, FHL)에서 23%의 근비대가 일어난 것을 통해 사다리 운동의 적용 가능성을 확인하였다(Hornberger Jr & Farrar, 2004).

3. Heat shock protein

Heat shock protein(HSP)은 분자적 샤프론(Chaperone)으로서 번역(Translation)이 일어나는 단백질 구조형성 초기에 중요한 역할을 한다. HSP는 다양한 스트레스에 대항하여 세포를 보호하고 생리학적으로 중요한 역할을 하는 물질이다. 이는 성장기의 신체에서 아미노산 배열의 접힘(Folding)을 유도하고 손상된 단백질의 재생을 촉진하는 기능을 가지고 있다(Locke, 1997). HSP는 분자량에 따라서 구분하며 그중 HSP70 family로부터 유도되는 HSP72가 골격근과 관련하여 가장 흥미롭게 연구되고 있다(Knowlton, 1995; Naito, Powers, Demirel, & Aoki, 2001).

HSP72는 고열, 고체온, 저산소증, 세포 손상 등의 치명적인 스트레스로부터 대항하여 보호 역할을 하며 근수축을 통한 근육에 주는 스트레스, 즉 운동이 골격근에서 HSP72의 발현을 유도한다고 보고되고 있다(Snoeckx, Cornelussen, Van Nieuwenhoven, Reneman, & Van der Vusse, 2001; Murlasits et al., 2006; Locke, Noble, & Atkinson, 1990; Salo, Donovan, & Davies, 1991). 이러한 HSP는 골격근 세포에서 근원섬유를 유지시키고 세포 단백질의 조립을 돕는다(Benjamin, Shelton, Garry, & Richardson, 1997; Golenhofen et al., 1998; Neufer et al., 1996). 또한 스트레스가 없는 정상상태에서 산화능력이 높은 지근섬유에 많이 함유되어 중요한 역할을 한다(Locke, Atkinson, Tanguay, & Noble, 1994; Locke, Noble, & Atkinson, 1991). 노화된 세포일수록 열자극(Heat stress)이 감소되고 이는 세포의 항상성을 감소시킨다고 보고되고 있다(Fargnoli, Kunisada, Fornace, Schneider, & Holbrook, 1990; Heydari, Takahashi, Gutschmann, You, & Richardson, 1994; Liu, Lee, Manalo, & Huang, 1996; Powers, Quindry, & Hamilton, 2004). 노화 동물 모델을 통해 확인한 결과 심근을 비롯하여 여러 조직에서 열충격반응(Heat shock response)이 약화된다고 한다(McArdle, Dillmann, Mestrlil, Faulkner, & Jackson, 2004). 하지만 Locke(2000)의

연구 결과에 의하면 노화 동물의 골격근이 보유하고 있는 HSP72 축적 수용 능력은 열충격(Heat stress)에 대해 일반 성체(Adult mice)와 유사한 정도의 축적 수용 능력을 가지고 있는 것으로 나타났으며, Naito et al.(2001)의 연구에서 유산소 훈련을 통해 발현된 HSP72가 유사하게 증가된 것을 확인하였다.

골격근 내에서의 HSP72의 기능이 분명하게 밝혀져 있지 않지만 많은 연구에서 HSP72가 근육의 상해와 근위축으로부터 방어적으로 역할을 한다는 결과를 나타냈다(Garramone Jr, Winters, Das, & Deckers, 1994; Naito et al., 2000). 반대로 근육의 불용(Disuse)로 인해 근육량이 감소할 때 HSP72 발현량이 감소하는 것을 관찰 하였으며 HSP72와 근육에서의 단백질 저하(Degradation)와 관계가 있을 것으로 보여 진다(Ku, Yang, Menon, & Thomason, 1995). Lengthening contraction을 통해 근육의 손상(Muscle damage)을 준 후 3일 뒤 힘(Force)을 측정하였을 때 HSP72를 20배가량 과발현 시킨 쥐는 정상 쥐와 비교하여 힘(Force)의 감소가 63% 더 낮게 나타났다(McArdle, Dillmann, Mestril, Faulkner, & Jackson, 2004). 이는 완전한 회복을 위해 일반적으로 14일이 소요되는 것을 더 빠르게 회복할 수 있는 효과를 기대할 수 있으며 노화 쥐에서도 유사한 효과를 얻을 수 있다(McArdle, Dillmann, Mestril, Faulkner, & Jackson, 2004). 또한 뒷다리 부유 모델에서 관찰한 결과 HSP72가 감소하여 근육에서 나타나는 단백질 분해(Degradation)와 관계가 있을 것으로 보이며 9주간의 뒷다리 부유 후 8주간의 중력재부하가 가해졌을 시 2주, 4주차 모두 HSP72 발현량의 증가가 나타났으므로 이를 통하여 운동 중재 후 더 큰 효과가 나타날 것으로 기대할 수 있다(Oishi et al., 2003; Fujino et al., 2009). 이러한 결과들은 HSP72가 근육의 크기와 단백질 분해와 손상으로 인한 힘(Force)의 감소로부터 방어적인 역할을 하는 것으로 기대할 수 있다.

Ⅲ. 연구 방법

1. 실험동물

본 연구의 실험동물은 9주령의 수컷 Sprague-Dawley rat으로 무작위 추출을 통해 총 21마리의 쥐를 CON 그룹(n=7), HRE 그룹(n=7), HEX 그룹(n=7), 3개의 그룹으로 나누어 배정하였다. 본 실험동물은 서울대학교 수의과 대학 실험동물실에서 멸균된 물과 사료를 제공하고 온도 22°C, 습도 60%, 밤낮 주기(12시간 점등/12시간 소등)를 유지하여 적합한 환경에서 사육되었다. CON group의 쥐는 30cm x 30cm의 케이지에 각각 한 마리씩 사육 하고, 뒷다리 부유 그룹(HRE, HEX)의 케이지는 길이 60cm x 폭 30cm x 높이 40cm 에 각각 한 마리씩 사육하였다.

Table 1. Research group

Group	Intervention	Duration
CON (n=7)	Weight bearing control	6 weeks
HRE (n=7)	Hindlimb unloading followed by weight bearing spontaneous recovery	2 weeks+4 weeks
HEX (n=7)	Hindlimb unloading followed by Ladder climbing exercise	2 weeks+4 weeks

2. 연구 설계

본 연구는 9주령의 수컷 Sprague-Dawley rat을 대상으로 2주간의 뒷다리 부유(Hindlimb unloading)를 한 후 중력재부하(Reloading)와 저항성 운동으로 인한 회복 효과를 근섬유 형태별로 확인하고자 하였다. 대조군(CON, control group), 뒷다리 부유 후 중력재부하 그룹(HRE, Hindlimb unloading and reloading), 뒷다리 부유 후 저항성 운동 그룹(HEX, Hindlimb unloading and resistance exercise)에 각각 7마리씩 배정하여 실험이 진행되었다. 모든 쥐는 일주일간의 적응 기간을 거친 후 HRE, HEX 그룹의 쥐꼬리에 테이핑 하여 뒷다리 부유를 처치하였다. 중재 기간 동안 모든 쥐는 자유롭게 먹이를 섭취할 수 있도록 하였다. 2주간의 뒷다리 부유 후 4주간의 중력재부하와 저항성 운동의 효과를 확인하기 위하여 악력측정을 통해 근기능을 평가하였다. 2주간의 뒷다리 부유 처치 전과 후 4주간의 중재 후 총 3회에 걸쳐 뒷다리 악력 측정을 시행하였다.

본격적 중재가 시작되기 전에 한주간의 적응기간을 거쳐 뒷다리 부유 전용 케이지와 저항성 운동에 익숙해지도록 하였다. 일주일의 적응기를 거친 후 HRE, HEX 그룹은 꼬리에 테이핑을 하여 도르래를 이용해 전용 케이지와 연결하였다. 뒷다리가 지면에 닿지 않고 앞다리만으로 자유롭게 이동 할 수 있도록 처치하였다. CON 그룹은 일반 케이지에서 사육 되었다.

2주간의 뒷다리 부유 처치 후 HRE 그룹은 부유 처치를 시행했던 뒷다리를 정상상태와 같이 지면으로 내려 중력재부하(체중부하)를 시행하였고, HEX 그룹은 점증적으로 중량을 증가시키는 저항성 사다리 운동을 각각 4주간 시행하였다. 그 후 48시간 뒤 부검을 진행 하였다.

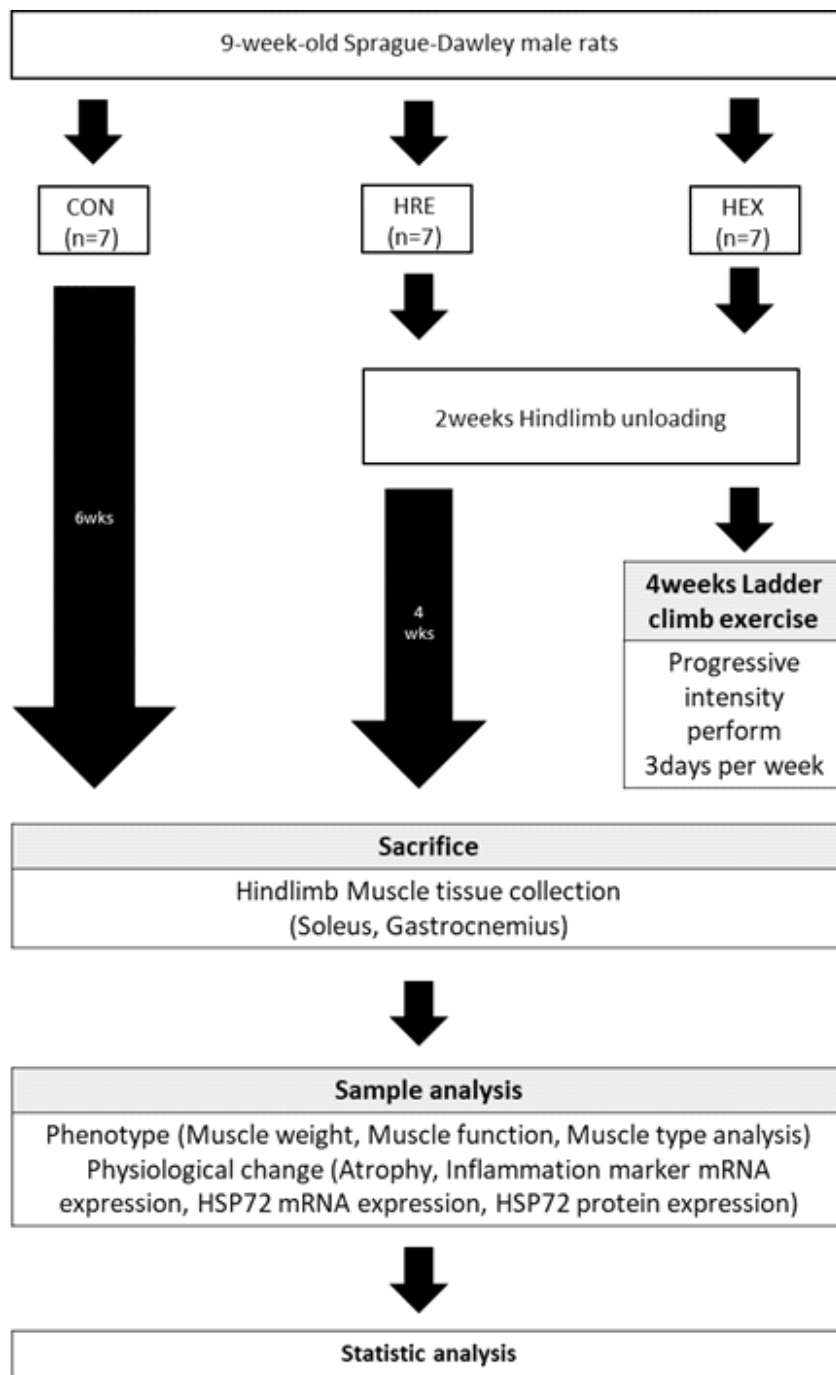


Figure 1. Research design

3. 뒷다리 부유 처치 프로토콜

쥐의 뒷다리를 부유하기 위해 꼬리를 테이핑 하여 도르래에 연결 할 수 있도록 하였다. 키네시오 테이프를 이용하여 꼬리에 부착, 고정하고 도르래에 끼울 수 있도록 고리형태로 만들어 연결 하였다. 길이 60cm x 폭 30cm x 높이 40cm 아크릴로 특수 제작된 케이지 위에 도르래를 끼워 넣은 철근을 고정하여 부유의 높이를 설정할 수 있도록 하고, 고리에 연결 된 꼬리는 지면에 뒷다리가 닿지 않는 높이에 고정하여 앞다리로만 자유롭게 움직일 수 있게 하였다. 철근에 끼워진 도르래는 360도 회전이 가능하도록 제작하여 식이 섭취 등의 움직임을 자유롭게 하였다.

4. 운동 프로토콜

HEX 그룹을 대상으로 2주간의 뒷다리 부유 처치 후 점증적 부하 증가를 기반으로 한 저항성 사다리 오르기 운동을 실시하였다. 사다리 운동은 4주간 주 3회 실시하였으며 85° 기울어진 간격 2cm, 폭 0.25m, 길이 1m인 사다리에서 시행하였다. 적응을 위해 처음 일주일간 낮은 강도의 부하로 사다리운동을 시행한 후 꼬리에 추를 매달아 점증적으로 부하를 증가시켜 운동을 실시하였다. 하루 한 번의 운동 수행은 총 10회를 반복하며 2주차부터 해당 무게 성공 시 매 회마다 30g씩 증가시켜 점증적으로 부하가 증가하도록 하였다.

Table 2. Exercise protocol

	Exercise period						
Week	1st			2nd	3rd	4th	
Load	0 g	50% of BW	60% of BW	50% of BW	70% of BW	90% of BW	
Repetitions				10 repetitions (Progressive increase 30g every success)			
Rest	2min, interval						
Frequency	3day / week for 4weeks (Total 12 sessions)						

5. Grip strength 측정

Grip strength는 Grip strength meter(Bioseb, France)를 사용하여 측정하였다. 뒷다리의 악력을 측정하며 측정 시 뒷발이 grasp grid를 잡도록 위치시키고 꼬리의 2분의 1 지점을 잡고 동일한 힘으로 잡아 당겨 쥐의 두 발이 grasp grid에서 떨어지기 직전 당겨지는 힘을 측정하였다. 5회를 실시하여 기록하고 힘의 단위는 g 으로 하였다. 측정 시기는 2주간의 뒷다리 부유 전과 후, 4주간의 각각의 중재 후 총 3회를 동일한 시기에 진행하였다.

6. 조직 적출

마지막 운동이 종료된 후 48시간 이후에 실험동물을 부검하였다. 부검은 12시간 절식 후에 진행하였다. 20% Urethane 용액을 복강 내 투여하여 마취하였다. 근조직은 가자미근(SOL, Soleus), 비복근(GAS, Gastrocnemius)을 적출하였다. 적출 직후 각 조직의 무게(Wet weight)를 측정하고 Cryotube에 넣어 액체 질소에 급냉각하여 -80°C에서 보관 후 분석하였다.

7. Real-time PCR

적출된 근육 조직에서 TRIzol Reagent(Invitrogen, USA)을 이용하여 Total RNA purification system(Invitrogen) 제조사의 protocol에 따라 Total RNA를 추출하였다. AccuPower CycleScript RT PreMix(Bioneer, Korea)를 이용해 역전사를 진행하고 mRNA의 cDNA는 Table 3. 에 제시된 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. SYBR Green PCR Kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염색한 후 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR Instrument system(Applied Biosystems, Cheshire, U.K.)을 이용해 상대발현량을 측정하였다. 각 mRNA 발현량은 GAPDH로 normalizing 하고 comparative Ct method $\Delta\Delta$ Ct 방법을 통해 분석하였다.

Table 3. Primer sequence

Target mRNA	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	GeneBank no.
GAPDH	ACATCATCCCTGCATCCACT	GGGAGTTGCTGTTGAAGTCA	NM_017008.4
HSP72	CGAGGGCATCGACTTCTACACG	ATCTGCGCCTTGTCAGCTTG	NM_031971.2
Atrogin-1	GAACATCATGCAGAGGCTGA	GTAGCCGGTCTTCACTGAGC	NM_133521.1
Murf-1	GCCATCCTGGACGAGAAGAAG	AGCGGCTTGCACTCAAG	NM_080903.1
IL-6	ACCACCCACAACAGACCACT	ACAGTGCATCATTCGCTGTT	NM_012589.2
TNF- α	GCCCAGACCCTCACACTC	CCACTCCAGCTGCTCCTCT	NM_012675.3

8. 단백질 추출 및 정량

단백질 추출을 위해 RIPA Buffer 500 μ l에 조직을 넣은 뒤 Homogenizer(SONICS & MATERIALS, INC., USA)를 이용하여 lysis하였다. Buffer에 담긴 조직을 4°C에서 10분마다 30초간 vortex mixer를 이용하여 3회간 섞어주고 4°C에서 1500rpm으로 20분간 원심분리기를 이용하여 200 μ l(~400 μ l)의 상층액을 분리하였다. Pierce BCA Protein Assay kit(Thermo Scientific, Rockford, USA)를 사용하여 Microplate Reader(Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)에 넣어 흡광도를 측정한 후 40 μ g의 단백질을 정량하였다. 정량된 단백질에 SDS-PAGE loading Buffer를 넣어 95°C Heating block에서 5분간 변성(Denature) 하였다. 이후 -20°C에 보관하여 실험을 진행 하였다.

9. SDS-PAGE

SDS-PAGE를 위해 H_2O , 30% Acrylamide, 1.5M Tris(pH 8.8), 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED를 이용하여 10%, 15%의 Seperating gel과 H_2O , 30% Acrylamide, 1.0M Tris(pH 6.8), 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED를 이용하여 5% Stacking gel을 만들어 사용하였다. 만들어진 Gel은 1X TGS Buffer(Running buffer)에 넣어 정량된 단백질 샘플을 각 well에 20 μ l씩 loading하였다. Size marker는 DokDo-MARK Broad range multi color(Elpis Biotechnology, Korea)를 사용하였다. Loading이 완료된 후 60V에서 약 20분, 100V에서 약 90분 간 전기영동 하였다.

10. Western blot

전기영동이 완료된 후 1X TG Buffer(Transfer buffer)에서 mini trans-blot, 3mm CHR paper, Gel, Methyl alcohol에 적신 PVDF membrane, 3mm CHR paper의 순서로 겹쳐 Cassette에 넣어 mini trans-blot에 고정하였다. 그 후 4°C에서 60V로 180분간 Transfer를 진행하였다. Transfer가 완료된 후 1X TBS-Tween Buffer(Washing Buffer)에 희석한 5% Skim milk에 membrane을 담가 상온의 shaker 위에서 1시간동안 blocking한 후 1차 항체 GAPDH(#2118), Troponin I-SS(SC-8119), Troponin I-FS(SC-30486), HSP72(ADI-SPA-810)를 5% Skim milk에 각각 1:1000, 1:500, 1:500, 1:250으로 희석하여 4°C에서 12시간동안 shaker 위에서 반응 시켰다. 1차 항체에 반응 시킨 뒤 5% Skim milk에 각각 Rabbit(1:5000), Goat(1:5000), Goat(1:5000), Mouse(1:2000) 2차 항체를 희석하여 1시간 동안 반응 시킨 후 1X TBS-Tween Buffer로 10분간 3번 washing한 뒤, Western Blotting Detection Reagent Kit를 이용하여 band를 발색시켰다. 발색된 band는 Microchemi 4.2 System(DNR Bio-Imagin System, Jerusalem, Isreal)을 사용하여 분석하고 Image J software를 통해 결과를 도출하였다.

11. 자료 처리

본 연구의 자료는 SPSS 22.0 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 기술 통계를 통해 각 항목별 평균과 표준 오차를 구하고 집단 간 차이의 검증을 위해 Independent t-test와 one-way ANOVA를 실시하였다. 사후 검정은 Tukey's post hoc을 실시하여 검증하고 모든 통계의 유의 수준은 $p < .05$ 로 설정하였다.

IV. 연구 결과

1. 2주간의 뒷다리 부유 후 근육별 무게(Wet weight) 변화

본 연구에 앞서, 뒷다리 부유로 인한 근위축의 효과검증을 위해 2주간 뒷다리 부유를 실시하였다. Soleus(SOL), Gastrocnemius(GAS)의 근육 무게를 체중으로 보정하여 대조군과 비교한 결과 SOL과 GAS에서 근육 무게가 유의하게 감소하였다.

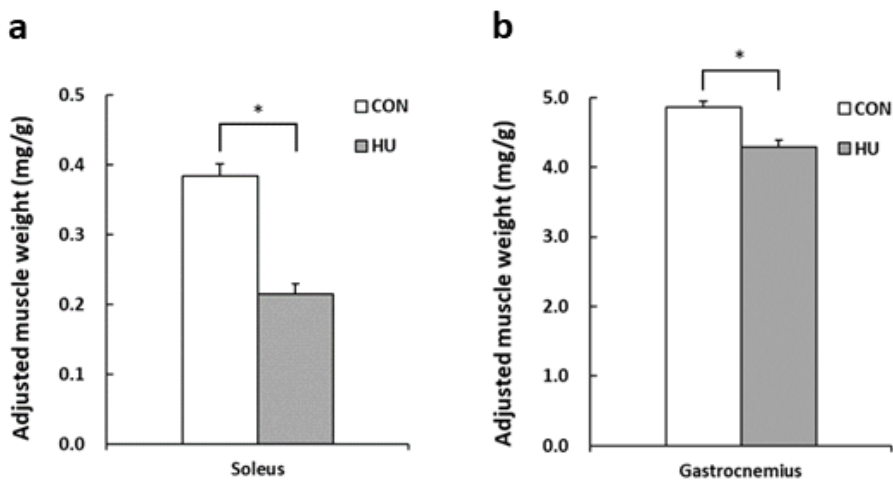


Figure 2. Changes in muscle weight after 2 weeks hindlimb unloading for soleus (a) and Gastrocnemius muscles (b).

* indicates significant change from control group ($P < .05$).

Statistical analysis was performed using Independent t-test with mean comparison in Tukey's test.

2. 4주간의 중력재부하와 저항성 운동 후 근육별 무게 변화

본 연구에서 근위축 회복 효과를 비교하기 위해 2주간의 뒷다리 부유 후 중력재부하와 저항성 운동을 각각 4주간 처치하여 SOL, GAS 각각의 무게를 체중으로 보정하여 비교하였다. 그 결과 4주간의 처치 후 SOL과 GAS 모두 근육 무게의 유의한 차이가 없었다.

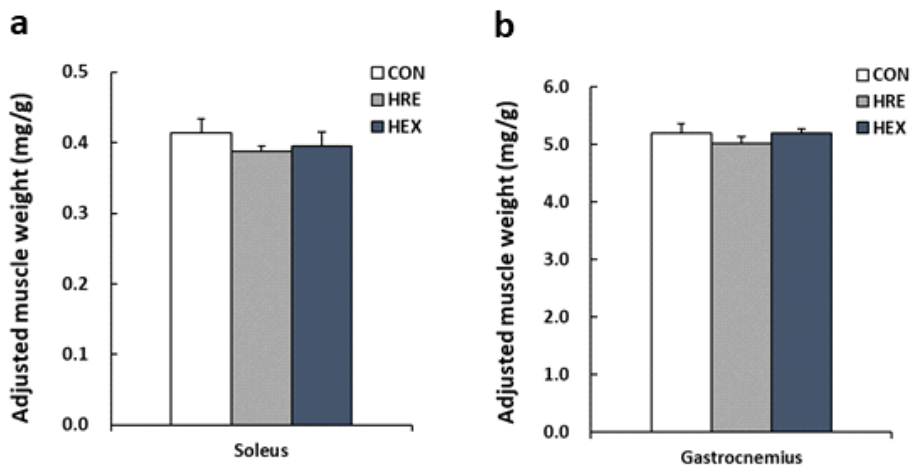


Figure 3. Changes in muscle weight after 2 weeks unloading and during 4 weeks reloading(HRE), 4 weeks resistance exercise (HEX) for soleus (a) and Gastrocnemius muscles (b). * indicates significant change from control group ($P < .05$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

3. Grip strength

본 연구에서 2주간의 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유도한 후, 4주간 중력재부하와 저항성 운동 처치로 인한 근기능의 차이를 확인하기 위해 뒷다리(Hindlimb)의 Grip strength를 측정하였다. 그 결과 2주간의 뒷다리 부유 후 근력이 감소되는 경향을 나타냈으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그 후 4주간 중력재부하를 시행한 그룹(HRE)과 4주간 저항성 운동을 실시한 그룹(HEX)을 6주차에서 비교한 결과 저항성 운동을 실시한 그룹에서 근기능이 유의하게 향상되었다.

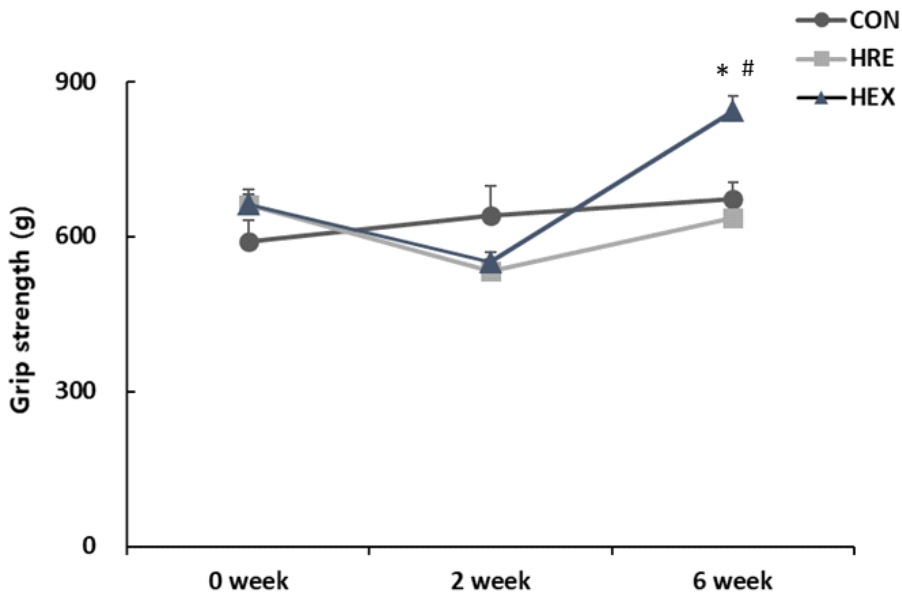


Figure 4. Changes in hindlimb grip strength 2 weeks unloading and during 4 weeks intervention in each group * $P < 0.05$ vs CON; # < 0.05 vs HRE. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

Table 4. Grip strength

	0 week	2 week	6 week
CON (n=7)	590.21±41.51(g)	640.25±58.30(g)	671.43±32.94(g)
HRE (n=7)	661.46±20.18(g)	532.08±23.99(g)	636.79±31.00(g)
HEX (n=7)	663.11±28.25(g)	550.05±20.25(g)	842.86±28.80(g)

4. 4주간의 중력재부하와 저항성 운동 후 근육별 근섬유 형태 변화

본 연구에서 근육별 근섬유 형태 변화를 확인하기 위해 SOL과 GAS에서 지근섬유를 대변하는 Troponin I-SS와 속근섬유를 대변하는 Troponin I-FS 단백질을 Western blot을 통해 분석하였다(Figure 5). 그 결과 SOL의 Troponin I-SS는 HRE 그룹 보다 HEX 그룹에서 증가된 경향을 보였으나 모든 그룹에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 5a, b). SOL의 Troponin I-FS는 CON과 HEX 그룹간의 유의한 차이는 없었으나 HRE 그룹에서 다른 두 그룹에 비하여 유의하게 증가 되었다(Figure 5a, c). GAS의 Troponin I-SS, Troponin I-FS 모두 그룹간의 유의한 차이를 나타내지 않았다(Figure 5d, e, f).

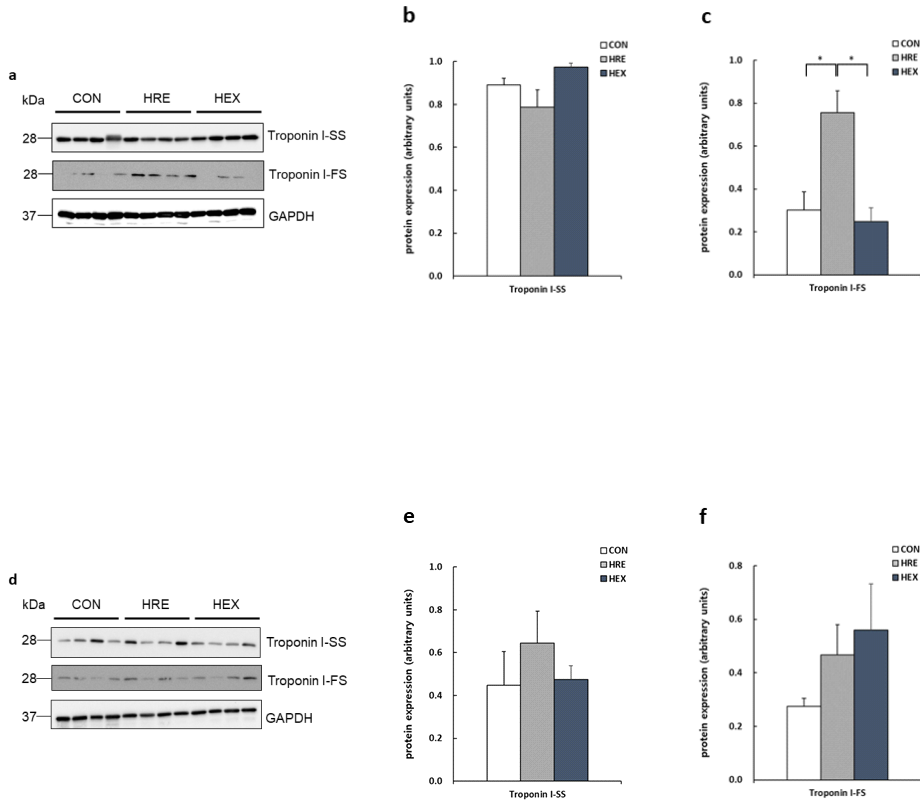


Figure 5. Expression of Troponin protein isoforms in soleus (a), (b), (c), and Gastrocnemius muscles (d), (e), (f). * indicates significant change from control group ($P < 0.05$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

5. 근위축 관련 인자와 염증 관련 인자의 mRNA 발현량

본 연구에서 중력재부하와 저항성 운동이 회복에 미치는 영향을 비교하기 위하여 RT-PCR을 통해 근위축 관련 인자(Atrogin-1, Murf-1)와 염증성 인자(TNF- α , IL-6) mRNA 발현량을 분석하였다. 그 결과 SOL에서 근위축 관련 인자인 Atrogin-1의 mRNA level은 HRE, HEX 두 그룹 모두 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였으나 Murf-1의 mRNA level은 유의한 차이가 나타나지 않았다(Figure 6a). SOL에서 염증성 인자인 TNF- α 의 mRNA level은 CON 그룹에 비해 HRE 그룹에서 유의하게 증가하였으나 HEX 그룹에선 유의한 차이를 나타내지 않았다(Figure 6b). IL-6의 mRNA level은 CON 그룹에 비해 HEX 그룹에서 유의하게 증가하였으나 HRE 그룹에선 유의한 차이가 나타나지 않았다(Figure 6b).

GAS에서 Atrogin-1과 Murf-1 의 mRNA level은 HRE, HEX 두 그룹 모두 CON 그룹에 비해 유의하게 감소한 것으로 나타났다(Figure 6c). TNF- α 와 IL-6의 mRNA level은 유의한 차이를 나타내지 않았다(Figure 6d).

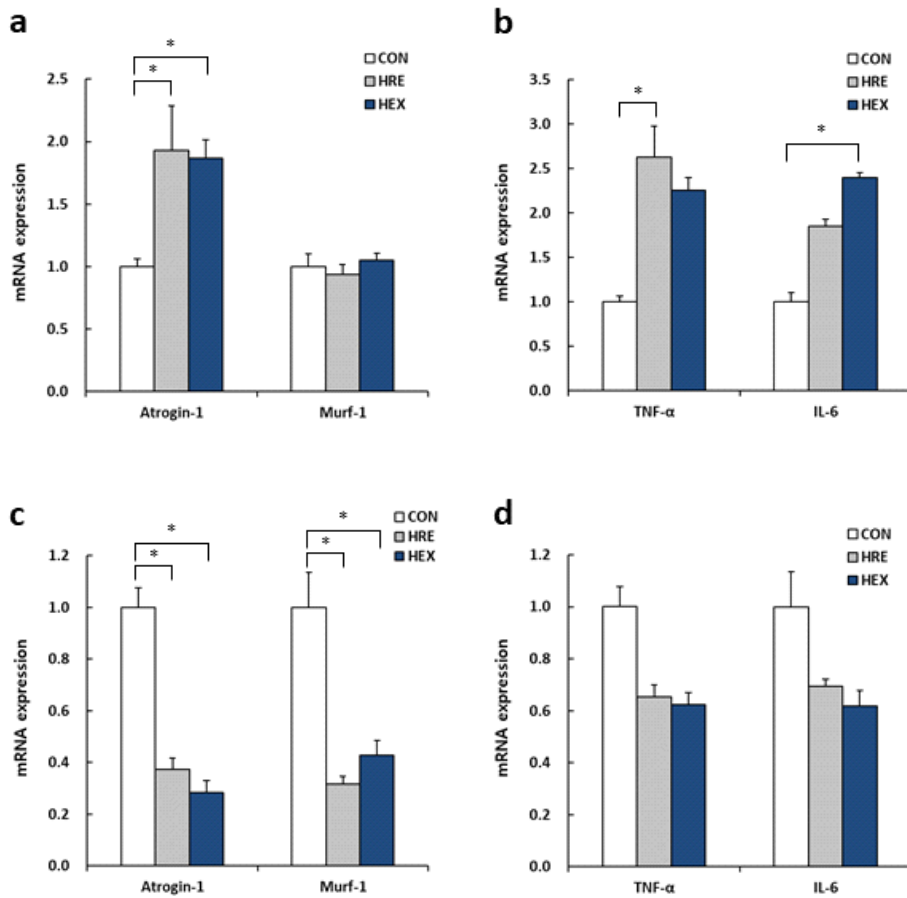


Figure 6. Expression of atrophy and inflammation relative markers mRNA level in soleus (a), (b) and Gastrocnemius muscles (c), (d). * indicates significant change from control group ($P < .05$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

6. HSP72 발현량

본 연구에서 4주간의 중력재부하와 저항성 운동이 근육에 따라 HSP72 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot과 RT-PCR을 통해 HSP72 단백질과 mRNA를 분석하였다. 4주간의 중력재부하(HRE)와 저항성 운동(HEX) 결과 SOL에서 HRE 그룹과 HEX 그룹의 HSP72 단백질 발현량이 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였다(Figure 7a, b). SOL에서 HSP72의 mRNA level 또한 HSP72 단백질 발현량과 유사하게 HRE 그룹과 HEX 그룹이 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였다(Figure 7e). 반면 GAS에서는 HSP72 단백질 발현량이 유의한 차이가 나타나지 않았다(Figure 7c, d). GAS에서 HSP72의 mRNA level은 HEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의하게 감소하였다(Figure 7f).

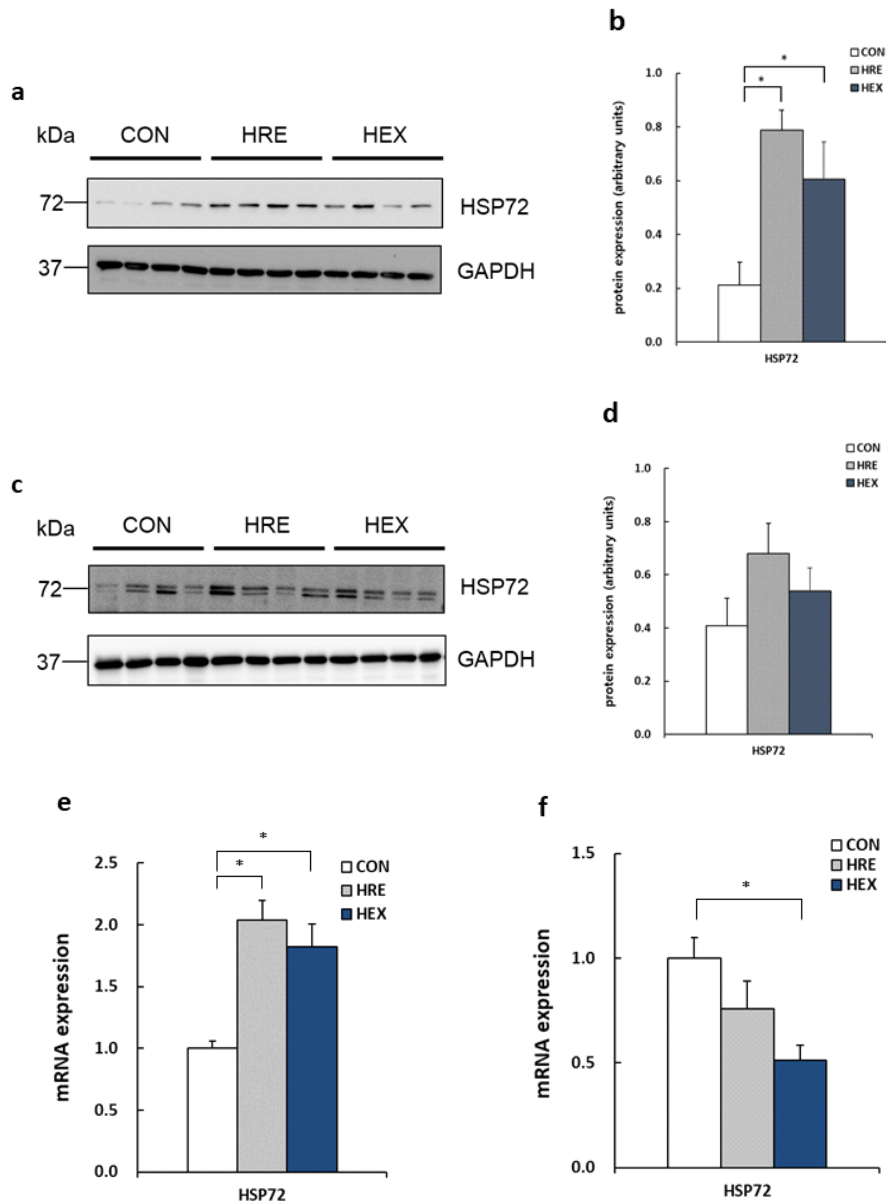


Figure 7. Expression of HSP72 protein and mRNA in soleus (a), (b), (e) and Gastrocnemius muscles (b), (c), (f). * indicates significant change from control group ($P < .05$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

V. 논 의

본 연구에서는 Sprague-Dawley rat을 대상으로 2주간의 뒷다리 부유(Hindlimb unloading)를 통해 근위축(Atrophy)을 유발하고, 4주간의 중력재부하(Reloading)와 저항성 사다리 운동을 실시하였다. 이를 통해 근섬유 형태가 다른 근육에 따라 근회복과 HSP72(Heat Shock Protein 72)의 발현량을 확인하고자 하였다. 대부분의 선행 연구에서는 중력재부하와 저항성 운동 각각의 중재를 통해 회복과 HSP72의 발현량을 비교하였으나 본 연구에서는 중력재부하와 저항성 사다리 운동 중재를 동시에 실시하여 근섬유 형태에 따라 그 효과를 비교하고 HSP72의 발현량을 확인하였다.

뒷다리 부유로 인한 근위축은 지근섬유에서 더 두드러지게 나타나므로 본 연구에서는 근섬유 형태에 따라 변화에 차이가 있을 것이라고 가설을 설정하였다. 근회복 정도와 HSP72 발현량을 근섬유 형태에 따라 비교하기 위해 약 90%가 지근섬유로 구성된 가자미근(Soleus, SOL)과 약 90% 이상이 속근섬유로 구성되어 있는 비복근(Gastrocnemius, GAS)을 분석하였다(Armstrong & Phelps, 1984; White et al., 2011).

본 연구에 앞서 뒷다리 부유(Hindlimb unloading)로 인한 근위축 효과를 확인하기 위해 2주간 뒷다리 부유를 실시한 결과 SOL과 GAS에서 모두 근육의 무게(Wet weight)가 유의하게 감소하였다(Figure 2). 이를 통해 2주간의 뒷다리 부유는 SOL와 GAS 두 근육 모두 근위축을 유발하는 것을 확인할 수 있다.

본 연구에서 2주간의 뒷다리 부유 후 회복 수준을 비교하기 위해 4주간의 중력재부하(HRE)와 저항성 운동 후(HEX) 근육별 무게를 비교하였다. 그 결과 중재를 실시한 두 그룹 모두 대조군과 비교하여 유의한 차이가 나타나지 않았으므로 4주간의 중력재부하와 저항성

운동은 근육의 무게를 정상으로 회복하는데 효과가 있는 것으로 볼 수 있다(Figure 3).

본 연구에서 2주간 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유발한 후 Grip strength 측정을 통해 근기능을 평가하였다. 그 결과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았지만 중재를 실시한 두 그룹의 Grip strength 평균값이 모두 약 100g이상 감소한 것으로 보아 근기능적으로 저하되었다고 할 수 있다(Figure 4, Table 4). 뒷다리 부유 후 4주간 실시한 중력재부하와 저항성 운동 각각의 처치가 근 기능적 회복에 차이가 있는지 확인하기 위해 Grip strength를 측정한 결과 근위축을 유발한 후 4주간 저항성 운동을 한 집단이 CON, HRE 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였다(Figure 4). 따라서 저항성 운동이 정상상태 이상으로 근기능을 향상시키는데 효과적인 것을 알 수 있다. 4주간 중력재부하를 실시한 HRE 그룹의 경우 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않는 것으로 보아 완전한 회복을 이루진 않았지만 근기능적으로 정상상태에 가깝게 회복이 이루어진 것을 알 수 있다(Figure 4, Table 4).

본 연구에서 중재 후 근섬유 형태 변화를 확인하기 위해 지근섬유와 속근섬유를 대변하는 단백질을 분석한 결과 SOL과 GAS에서 각각 다른 형태변화를 관찰하였다(Figure 5). 중력재부하를 시행한 그룹(HRE)의 속근섬유(Troponin I-FS)가 대조군과 저항성 운동을 시행한 그룹(HEX)과 비교하여 유의하게 높게 나타났다(Figure 5c). 약 90%가 지근섬유로 구성된 SOL에서 속근섬유가 증가하는 것은 뒷다리 부유 후 근위축이 나타나는 현상으로 잘 알려져 있다(Ishihara et al., 2004; Ohira, Kawano, Ohira, Goto, & Ohira, 2015). 따라서 본 연구 결과 HRE 그룹의 SOL에서 대조군, HEX 그룹과 비교하여 속근섬유(Troponin I-FS)가 증가한 것은 선행연구와 같이 근위축이 발생한 후 완전히 회복되지 않았음을 의미한다. 또한 운동중재를 통해 다시 정상과 같이 회복이 될 때 속근섬유의 비율이 감소하는 것으로 알려져 있다(Ohira, Kawano, Ohira, Goto, & Ohira, 2015). 본 연구 결과 SOL에서

HEX 그룹의 속근섬유가 HRE 그룹에 비해 유의하게 낮게 나타났으며 정상상태를 대변하는 CON 그룹과도 유의한 차이가 나지 않았으므로 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유발한 뒤 운동 중재를 통해 HRE 그룹에 비해 회복된 것으로 볼 수 있다(Ishihara et al., 2004; Ohira, Kawano, Ohira, Goto, & Ohira, 2015).

본 연구에서 근위축시 증가하는 근위축 관련 인자와 염증관련 인자를 통해 회복의 정도를 중재별, 근육별로 비교하였다. HRE, HEX 두 그룹의 SOL에서 근위축 관련 인자인 Atrogin-1과 염증 관련 인자인 TNF- α , IL-6의 mRNA 발현량이 CON 그룹에 비해 유의하게 증가한 것으로 보아 아직 완전한 회복 상태에 이르지 못한 것으로 사료된다(Figure 6a, b). GAS의 경우 근위축 관련 인자인 Atrogin-1과 Murf-1 모두 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다(Figure 6c). 염증관련 인자인 TNF- α , IL-6는 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타내진 않았지만 근위축 관련 인자와 함께 감소되는 경향을 나타낸 것을 보아 GAS에서는 SOL에 비하여 정상과 같이 회복에 이르렀다고 사료된다(Figure 6c, d). 하지만 mRNA level을 통하여 비교, 분석하였으므로 보다 정확한 판단을 위해 추후 연구에서 단백질 수준에서의 분석이 필요하다.

근회복과 관련하여 Grip strength, Troponin protein, Inflammation marker, Atrophy marker의 종합적인 확인을 통해 저항성 사다리 운동이 HRE에 비해 더 빠른 회복을 유도하는 것을 확인하였다. 반면 HEX그룹에 비해 HRE 그룹의 SOL에서 정상과 같이 완전한 회복을 이루지 못하고 근손상(Muscle damage)이 남아있는 것으로 판단된다.

HSP72는 고열, 고체온, 세포 손상 등 다양한 스트레스에 대항하여 세포를 보호하는 물질로 운동이 HSP72의 발현을 유도한다고 보고되고 있다(Snoeckx, Cornelussen, Van Nieuwenhoven, Reneman, & Van der Vusse, 2001; Murlasits et al., 2006; Locke, Noble, & Atkinson, 1990; Salo, Donovan, & Davies, 1991). 운동을 하면 근육에 열이 발생하고 사람과 쥐 모두 HSP72의 발현이 증가한다. 선행 연구에서 9주간 뒷다리

부유를 통해 근 위축을 유발하고 2주, 4주, 8주간 중력재부하를 실시하여 각각의 시점의 SOL에서 HSP72의 발현량을 확인한 결과 2주, 4주 동안 중력재부하를 실시한 그룹에서 유의하게 증가하는 것을 확인 하였다(Y Oishi et al., 2003). 이와는 반대로 뒷다리 부유 후 3일, 7일 14일의 중력재부하를 실시하였을 때 7일에 HSP72의 발현이 증가하였다가 14일부터 정상상태로 돌아온 결과가 나타났다(Y Oishi et al., 2008). 사람을 대상으로 한 연구에서 혈중 HSP72의 발현량은 60분간 트레드밀 운동 직후 가장 높게 증가 되었으며 8시간 후에 정상상태와 같이 돌아온 것을 확인하였다. 또한 대퇴부의 외측광근(Vastus lateralis)에서 HSP72의 mRNA 발현량이 2시간 후 가장 높게 발현되었으며 24시간 뒤엔 정상상태에 가깝게 돌아온 것을 확인하였다(Konopka et al., 2010). HSP72의 단백질 수준의 변화는 개체 간 차이가 존재하였지만 유의성이 나타나는 개체에서는 mRNA 발현 양상과 유사하게 운동 후 2시간 뒤 가장 높게 나타났으며 24시간 뒤에는 발현량이 정상과 같았다(Walsh et al., 2001). 따라서 본 연구에서 실시한 4주간의 중재는 분자생물학적 적응(Adaptation)으로 인하여 SOL와 GAS에서 변화의 차이를 명확하게 관찰하기에는 오랜 기간으로 사료되므로 추후 연구에서는 변화를 확인할 수 있는 중재 기간과 시점을 설정하여 관찰 필요가 있다.

HSP72는 스트레스가 없는 정상상태에서 지근섬유에 많이 함유되어 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Locke, Atkinson, Tanguay, & Noble, 1994; Locke, Noble, & Atkinson, 1991). 단발적인 운동 후 사람의 대퇴근에서 시간에 따라 HSP70의 발현을 확인한 결과 속근섬유에 비해 지근섬유에서 크게 증가하는 것으로 나타났다(Tupling, Bombardier, Stewart, Vigna, & Aquil, 2007). 따라서 이는 본 연구에서 HSP72 발현의 유의미한 차이를 나타내는 양상이 근육에 따라 다르게 나타나는 것의 원인 중 하나로 사료된다(Figure 7).

HSP72와 분자적 구조와 특성이 유사한 HSP70은 면역세포에 사이토카인(Cytokine) 생산을 자극하는 것으로 알려져 있다(Asea et al., 2000; Multhoff et al., 1999). HSP70가 원형질막(Plasma membrane)에

존재하는 단백질과 결합하여 단핵구(Monocyte)에서 염증성 인자(Pro-inflammatory cytokine)인 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6의 발현량을 증가시킨다(Asea et al., 2000; Multhoff et al., 1999). 사람을 대상으로 한 연구에서 9주간 운동 후 Quadriceps에서 염증 관련 인자를 확인한 결과 유의한 차이가 나타나지 않았지만 감소되는 경향을 보였으며 HSP70의 mRNA 발현량은 유의하게 감소된 것을 확인하였다(Konopka et al., 2010). 사람을 대상으로 한 또 다른 선행 연구에서 60분의 트레드밀 운동 후 근손상 지표로서 사람의 혈중 CK(Creatine Kinase)를 확인한 결과 혈중 CK 발현량과 유사하게 HSP72의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Walsh et al., 2001). 따라서 본 연구의 SOL에서 염증관련 인자의 증가와 함께 HSP72 발현량 변화 양상이 나타난 것으로 사료된다(Figure 7b). 하지만 본 연구에서는 현상만을 관찰하여 회복과 직접적인 관계를 증명하지 못하였으므로 추후 연구에서는 회복에 직접적인 관계를 규명할 수 있도록 추가적인 실험이 필요하다.

참 고 문 헌

- Adams, G. R., Cheng, D. C., Haddad, F., & Baldwin, K. M. (2004). Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. *Journal of Applied Physiology*, *96*(5), 1613–1618. doi: 10.1152/jappphysiol.01162.2003
- Adams, G. R., Haddad, F., Bodell, P. W., Tran, P. D., & Baldwin, K. M. (2007). Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. *Journal of Applied Physiology*, *103*(5), 1644–1654. doi: 10.1152/jappphysiol.00669.2007
- Akima, H., Kawakami, Y., Kubo, K., Sekiguchi, C., Ohshima, H., Miyamoto, A., & Fukunaga, T. (2000). Effect of short-duration spaceflight on thigh and leg muscle volume. *Medicine and science in sports and exercise*, *32*(10), 1743–1747. doi: 10.1097/00005768-200010000-00013
- Appell, H., Duarte, J., & Soares, J. (1990). Muscle atrophy following immobilization. *Sports medicine*, 42–58. doi: 10.2165/00007256-199010010-00005
- Aragno, M., Mastrocola, R., Catalano, M. G., Brignardello, E., Danni, O., & Boccuzzi, G. (2004). Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats. *Diabetes*, *53*(4), 1082–1088. doi: 10.2337/diabetes.53.4.1082
- Armstrong, R., & Phelps, R. (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Developmental dynamics*, *171*(3), 259–272. doi: 10.1002/aja.1001710303
- Armstrong, R., Warren, G., & Warren, J. (1991). Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports medicine*, *12*(3),

- 184–207. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Gordon_Warren/publication/21370678_Mechanisms_of_Exercise-Induced_Muscle_Fibre_Injury/links/00b7d5217ec32addb2000000.pdf
- Asea, A., Kraeft, S.-K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., . . . Calderwood, S. K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature medicine*, 6(4), 435–442. doi: 10.1038/74697
- Baldwin, K., Valdez, V., Herrick, R., MacIntosh, A., & Roy, R. (1982). Biochemical properties of overloaded fast-twitch skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 52(2), 467–472. doi: 10.1152/jappl.1982.52.2.467
- Benjamin, I. J., Shelton, J., Garry, D. J., & Richardson, J. A. (1997). Temporospatial expression of the small HSP/αB crystallin in cardiac and skeletal muscle during mouse development. *Developmental dynamics*, 208(1), 75–84. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199701)208:1<75::AID-AJA7>3.0.CO;2-Z
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., . . . Glass, D. J. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology*, 3(11), 1014–1019. doi: 10.1038/ncb1101-1014
- D'Aunno, D. S., Thomason, D. B., & Booth, F. W. (1990). Centrifugal intensity and duration as countermeasures to soleus muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 69(4), 1387–1389. doi: 10.1152/jappl.1990.69.4.1387
- Darr, K. C., & Schultz, E. (1989). Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *Journal of Applied Physiology*, 67(5), 1827–1834. doi:

10.1152/jappl.1989.67.5.1827

- Duncan, N. D., Williams, D. A., & Lynch, G. S. (1998). Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 77(4), 372-378. doi: 10.1007/s004210050347
- Dupont-Versteegden, E. E., Fluckey, J. D., Knox, M., Gaddy, D., & Peterson, C. A. (2006). Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. *Journal of Applied Physiology*, 101(1), 202-212. doi: 10.1152/japplphysiol.01540.2005
- Edgerton, V. R., & Roy, R. R. (1994). Neuromuscular adaptation to actual and simulated weightlessness. *Advances in space biology and medicine*, 4, 33-67. doi: 10.1002/cphy.cp040132
- Esser, K. (2008). Regulation of mTOR signaling in skeletal muscle hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 8(4), 338-339.
- Fargnoli, J., Kunisada, T., Fornace, A. J., Schneider, E. L., & Holbrook, N. J. (1990). Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(2), 846-850. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/87/2/846.long>
- Febbraio, M., & Koukoulas, I. (2000). HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *Journal of Applied Physiology*, 89(3), 1055-1060. doi: 10.1152/jappl.2000.89.3.1055
- Fitts, R. H., Metzger, J. M., Riley, D. A., & Unsworth, B. (1986). Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *Journal of Applied Physiology*, 60(6),

- 1946–1953. doi: 10.1152/jappl.1986.60.6.1946
- Fry, A. C. (2004). The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports medicine*, 34(10), 663–679. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/18d6/c4e216c5c8de5cada5d3f8630aba61b05af5.pdf>
- Fujino, H., Ishihara, A., Murakami, S., Yasuhara, T., Kondo, H., Mohri, S., . . . Roy, R. (2009). Protective effects of exercise preconditioning on hindlimb unloading induced atrophy of rat soleus muscle. *Acta Physiologica*, 197(1), 65–74. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01984.x
- Fujino, H., Ishihara, A., Murakami, S., Yasuhara, T., Kondo, H., Mohri, S., . . . Roy, R. R. (2009). Protective effects of exercise preconditioning on hindlimb unloading-induced atrophy of rat soleus muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, 197(1), 65–74. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01984.x
- Garramone Jr, R. R., Winters, R. M., Das, D. K., & Deckers, P. J. (1994). Reduction of skeletal muscle injury through stress conditioning using the heat-shock response. *Plastic and reconstructive surgery*, 93(6), 1242–1247. Retrieved from http://journals.lww.com/plasreconsurg/Abstract/1994/05000/Reduction_of_Skeletal_Muscle_Injury_Through_Stress.21.aspx
- Goldberg, A. L. (1968). Protein synthesis during work-induced growth of skeletal muscle. *The Journal of cell biology*, 36(3), 653. Retrieved from <http://jcb.rupress.org/content/jcb/36/3/653.full.pdf>
- Golenhofen, N., Ness, W., Koob, R., Htun, P., Schaper, W., & Drenckhahn, D. (1998). Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein α B-crystallin to Z lines of myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 274(5), H1457–H1464. doi:

10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1457

- Grosset, J. F., & Onambele Pearson, G. (2008). Effect of foot and ankle immobilization on leg and thigh muscles' volume and morphology: A case study using magnetic resonance imaging. *The Anatomical Record*, 291(12), 1673–1683. doi: 10.1002/ar.20759
- Hanson, A. M., Stodieck, L. S., Cannon, C. M., Simske, S. J., & Ferguson, V. L. (2010). Seven days of muscle re-loading and voluntary wheel running following hindlimb suspension in mice restores running performance, muscle morphology and metrics of fatigue but not muscle strength. *Journal of muscle research and cell motility*, 31(2), 141–153. doi: 10.1007/s10974-010-9218-5
- Hather, B., Tesch, P., Buchanan, P., & Dudley, G. (1991). Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. *Acta Physiologica*, 143(2), 177–185. doi: 10.1111/j.1748-1716.1991.tb09219.x
- Herbert, M., Roy, R., & Edgerton, V. (1988). Influence of one-week hindlimb suspension and intermittent high load exercise on rat muscles. *Experimental neurology*, 102(2), 190–198. doi: 10.1016/0014-4886(88)90093-3
- Heydari, A., Takahashi, R., Gutschmann, A., You, S., & Richardson, A. (1994). Hsp70 and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 50(11), 1092–1098. Retrieved from http://libproxy.snu.ac.kr/a64da1d/_Lib_Proxy_Url_Https/link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBBF01923466.pdf
- Hornberger Jr, T. A., & Farrar, R. P. (2004). Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian journal of*

- applied physiology*, 29(1), 16–31. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Troy_Hornberger/publication/n/8463637_Physiological_Hypertrophy_of_the_FHL_Muscle_Following_8_Weeks_of_Progressive_Resistance_Exercise_in_the_Rat/links/02e7e5207d1c087a7e000000.pdf
- Hurst, J. E., & Fitts, R. H. (2003). Hindlimb unloading-induced muscle atrophy and loss of function: protective effect of isometric exercise. *Journal of Applied Physiology*, 95(4), 1405–1417. doi: 10.1152/japplphysiol.00516.2002
- Ishihara, A., Kawano, F., Ishioka, N., Oishi, H., Higashibata, A., Shimazu, T., & Ohira, Y. (2004). Effects of running exercise during recovery from hindlimb unloading on soleus muscle fibers and their spinal motoneurons in rats. *Neuroscience research*, 48(2), 119–127. doi: 10.1016/j.neures.2003.10.013
- Jung, S., Ahn, N., Kim, S., Byun, J., Joo, Y., Kim, S., . . . Kim, K. (2015). The effect of ladder-climbing exercise on atrophy/hypertrophy-related myokine expression in middle-aged male Wistar rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 65(6), 515–521. doi: 10.1007/s12576-015-0388-1
- Kilgore, J. L., Musch, T. I., & Ross, C. R. (1998). Physical activity, muscle, and the HSP70 response. *Canadian journal of applied physiology*, 23(3), 245–260. doi: 10.1139/h98-013
- Kirby, C. R., Ryan, M. J., & Booth, F. W. (1992). Eccentric exercise training as a countermeasure to non-weight-bearing soleus muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 73(5), 1894–1899. doi: 10.1152/jappl.1992.73.5.1894
- Knowlton, A. A. (1995). The role of heat shock proteins in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 27(1), 121–131. doi: 10.1016/S0022-2828(08)80012-0

- Konopka, A. R., Douglass, M. D., Kaminsky, L. A., Jemiolo, B., Trappe, T. A., Trappe, S., & Harber, M. P. (2010). Molecular adaptations to aerobic exercise training in skeletal muscle of older women. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 65(11), 1201–1207. doi: 10.1093/gerona/glq109
- Ku, Z., Yang, J., Menon, V., & Thomason, D. (1995). Decreased polysomal HSP-70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 268(6), C1369–C1374. doi: 10.1152/ajpcell.1995.268.6.C1369
- LeBlanc, A., Lin, C., Shackelford, L., Sinitsyn, V., Evans, H., Belichenko, O., . . . Bakulin, A. (2000). Muscle volume, MRI relaxation times (T2), and body composition after spaceflight. *Journal of Applied Physiology*, 89(6), 2158–2164. doi: 10.1152/jappl.2000.89.6.2158
- Leonard, J. I., Leach, C. S., & Rambaut, P. C. (1983). Quantitation of tissue loss during prolonged space flight. *The American journal of clinical nutrition*, 38(5), 667–679. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/38/5/667.short>
- Leterme, D., & Falempin, M. (1994). Compensatory effects of chronic electrostimulation on unweighted rat soleus muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 426(1), 155–160. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007%2F00374683?LI=true>
- Liu, A.-C., Lee, Y.-K., Manalo, D., & Huang, L. E. (1996). Attenuated heat shock transcriptional response in aging: molecular mechanism and implication in the biology of aging. *In Stress-inducible cellular responses* (pp. 393–408): Springer.

- Retrieved from
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-9088-5_26
- Liu, Y., & Steinacker, J. M. (2001). Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci*, 6(D12-25), D12-D25. Retrieved from
<https://www.bioscience.org/2001/v6/d/liu/fulltext.htm>
- Locke, M. (1997). 5 The Cellular Stress Response to Exercise: Role of Stress Proteins. *Exercise and sport sciences reviews*, 25(1), 105-136. Retrieved from
http://journals.lww.com/acsm-essr/Citation/1997/00250/5_The_Cellular_Stress_Response_to_Exercise__Role.7.aspx
- Locke, M. (2000). Heat shock transcription factor activation and hsp72 accumulation in aged skeletal muscle. *Cell stress & chaperones*, 5(1), 45-51. doi: 10.1043/1355-8145(2000)005<0045:HSTFAA>2.0.CO;2
- Locke, M., Atkinson, B. G., Tanguay, R. M., & Noble, E. G. (1994). Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 266(5), C1240-C1246. doi: 10.1152/ajpcell.1994.266.5.C1240
- Locke, M., Noble, E. G., & Atkinson, B. G. (1990). Exercising mammals synthesize stress proteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 258(4), C723-C729. doi: 10.1152/ajpcell.1990.258.4.C723
- Locke, M., Noble, E. G., & Atkinson, B. G. (1991). Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 261(5), C774-C779. doi: 10.1152/ajpcell.1991.261.5.C774

- Maki, T., Yamamoto, D., Nakanishi, S., Iida, K., Iguchi, G., Takahashi, Y., . . . Okimura, Y. (2012). Branched-chain amino acids reduce hindlimb suspension-induced muscle atrophy and protein levels of atrogen-1 and MuRF1 in rats. *Nutrition Research*, 32(9), 676–683. doi: 10.1016/j.nutres.2012.07.005
- McArdle, A., Dillmann, W. H., Mestril, R., Faulkner, J. A., & Jackson, M. J. (2004). Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *The FASEB journal*, 18(2), 355–357. doi: 10.1096/fj.03-0395fje
- Morey-Holton, E., & Wronski, T. (1982). Animal models for simulating weightlessness.
- Multhoff, G., Mizzen, L., Winchester, C. C., Milner, C. M., Wenk, S., Eissner, G., . . . Johnson, J. (1999). Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Experimental hematology*, 27(11), 1627–1636. doi: 10.1016/S0301-472X(99)00104-6
- Murlasits, Z., Cutlip, R. G., Geronilla, K. B., Rao, K. M. K., Wonderlin, W. F., & Alway, S. E. (2006). Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. *Experimental gerontology*, 41(4), 398–406. doi: 10.1016/j.exger.2006.01.005
- Musacchia, X., & Fagette, S. (1997). Weightlessness simulations for cardiovascular and muscle systems: validity of rat models. *Journal of gravitational physiology: a journal of the International Society for Gravitational Physiology*, 4(3), 49–59. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/11541869>
- Naito, H., Powers, S. K., Demirel, H. A., & Aoki, J. (2001). Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old

- rats. *Medicine and science in sports and exercise*, 33(5), 729-734. doi: 10.1097/00005768-200105000-00008
- Naito, H., Powers, S. K., Demirel, H. A., Sugiura, T., Dodd, S. L., & Aoki, J. (2000). Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *Journal of Applied Physiology*, 88(1), 359-363. doi: 10.1152/jappl.2000.88.1.359
- Neufer, P. D., Ordway, G. A., Hand, G. A., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Benjamin, I. J., & Williams, R. S. (1996). Continuous contractile activity induces fiber type specific expression of HSP70 in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(6), C1828-C1837.
- Ohira, T., Kawano, F., Ohira, T., Goto, K., & Ohira, Y. (2015). Responses of skeletal muscles to gravitational unloading and/or reloading. *The Journal of Physiological Sciences*, 65(4), 293-310. doi: 10.1007/s12576-015-0375-6
- Ohira, T., Terada, M., Kawano, F., Nakai, N., Ogura, A., & Ohira, Y. (2011). Region-specific responses of adductor longus muscle to gravitational load-dependent activity in Wistar Hannover rats. *PLoS One*, 6(6), e21044. doi: 10.1371/journal.pone.0021044
- Ohira, Y., Jiang, B., Roy, R. R., Oganov, V., Ilyina-Kakueva, E., Marini, J., & Edgerton, V. (1992). Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology*, 73(2), S51-S57. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1388148>
- Ohira, Y., Yoshinaga, T., Nonaka, I., Ohara, M., Yoshioka, T., Yamashita-Goto, K., . . . Shenkman, B. S. (2000). Histochemical responses of human soleus muscle fibers to long-term bedrest with or without countermeasures. *The Japanese journal of physiology*, 50(1), 41-47. doi:

10.2170/jjphysiol.50.41

- Ohira, Y., Yoshinaga, T., Ohara, M., Nonaka, I., Yoshioka, T., Yamashita-Goto, K., . . . Edgerton, V. (1999). Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without loading. *Journal of Applied Physiology*, 87(5), 1776–1785. doi: 10.1152/jappl.1999.87.5.1776
- Oishi, Y., Ogata, T., Yamamoto, K. i., Terada, M., Ohira, T., Ohira, Y., . . . Roy, R. (2008). Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiologica*, 192(3), 381–395. doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01747.x
- Oishi, Y., Taniguchi, K., Matsumoto, H., Kawano, F., Ishihara, A., & Ohira, Y. (2003). Upregulation of HSP72 in reloading rat soleus muscle after prolonged hindlimb unloading. *Jpn J Physiol*, 53(4), 281–286. doi: 10.2170/jjphysiol.53.281
- Oishi, Y., Taniguchi, K., Matsumoto, H., Kawano, F., Ishihara, A., & Ohira, Y. (2003). Upregulation of HSP72 in reloading rat soleus muscle after prolonged hindlimb unloading. *The Japanese journal of physiology*, 53(4), 281–286. doi: 10.2170/jjphysiol.53.281
- Powers, S. K., Quindry, J., & Hamilton, K. (2004). Aging, exercise, and cardioprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019(1), 462–470. doi: 10.1196/annals.1297.084
- Rittweger, J., Frost, H. M., Schiessl, H., Ohshima, H., Alkner, B., Tesch, P., & Felsenberg, D. (2005). Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study. *Bone*, 36(6), 1019–1029. doi: 10.1016/j.bone.2004.11.014
- Salo, D. C., Donovan, C. M., & Davies, K. J. (1991). HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in

- skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(3), 239–246. doi: 10.1016/0891-5849(91)90119-N
- Seo, D. Y., Lee, S. R., Kim, N., Ko, K. S., Rhee, B. D., & Han, J. (2014). Humanized animal exercise model for clinical implication. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 466(9), 1673–1687. doi: 10.1007/s00424-014-1496-0
- Seward, D. J., Haney, J. C., Rudnicki, M. A., & Swoap, S. J. (2001). bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(2), C408–C413. doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.2.C408
- Snoeckx, L. H., Cornelussen, R. N., Van Nieuwenhoven, F. A., Reneman, R. S., & Van der Vusse, G. J. (2001). Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiological Reviews*, 81(4), 1461–1497. doi: 10.1152/physrev.2001.81.4.1461
- Talmadge, R. J. (2000). Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle & nerve*, 23(5), 661–679. doi: 10.1002/(SICI)1097-4598(200005)23:5<661::AID-MUS3>3.0.CO;2-J
- Tesch, P., Ekberg, A., Lindquist, D., & Trieschmann, J. (2004). Muscle hypertrophy following 5 week resistance training using a non gravity dependent exercise system. *Acta Physiologica Scandinavica*, 180(1), 89–98. doi: 10.1046/j.0001-6772.2003.01225.x
- Thomason, D., Herrick, R., Surdyka, D., & Baldwin, K. (1987). Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *Journal of Applied Physiology*, 63(1), 130–137. doi: 10.1152/jappl.1987.63.1.130

- Thomason, D. B., & Booth, F. W. (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *Journal of Applied Physiology*, 68(1), 1–12. doi: 10.1152/jappl.1990.68.1.1
- Trappe, S., Creer, A., Minchev, K., Slivka, D., Louis, E., Luden, N., & Trappe, T. (2008). Human soleus single muscle fiber function with exercise or nutrition countermeasures during 60 days of bed rest. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(3), R939–R947. doi: 10.1152/ajpregu.00761.2007
- Trappe, S., Creer, A., Slivka, D., Minchev, K., & Trappe, T. (2007). Single muscle fiber function with concurrent exercise or nutrition countermeasures during 60 days of bed rest in women. *Journal of Applied Physiology*, 103(4), 1242–1250. doi: 10.1152/japplphysiol.00560.2007
- Tsika, R., Herrick, R., & Baldwin, K. (1987). Interaction of compensatory overload and hindlimb suspension on myosin isoform expression. *Journal of Applied Physiology*, 62(6), 2180–2186. doi: 10.1152/jappl.1987.62.6.2180
- Tupling, A. R., Bombardier, E., Stewart, R., Vigna, C., & Aquiri, A. E. (2007). Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise. *Journal of Applied Physiology*, 103(6), 2105–2111. doi: 10.1152/japplphysiol.00771.2007
- Vandenburgh, H., & Kaufman, S. (1979). In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science*, 203(4377), 265–268. doi: 10.1126/science.569901
- Vermaelen, M., Marini, J. F., Chopard, A., Benyamin, Y., Mercier, J., & Astier, C. (2005). Ubiquitin targeting of rat muscle proteins during short periods of unloading. *Acta Physiologica*, 185(1),

33-40. doi: 10.1111/j.1365-201X.2005.01446.x

- Walsh, R., Koukoulas, I., Garnham, A., Moseley, P., Hargreaves, M., & Febbraio, M. (2001). Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell stress & chaperones*, 6(4), 386-393. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC434422/pdf/i1466-1268-6-4-386.pdf>
- Wang, X., Kawano, F., Matsuoka, Y., Fukunaga, K., Terada, M., Sudoh, M., . . . Ohira, Y. (2006). Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(4), C981-C989. doi: 10.1152/ajpcell.00298.2005
- Welch, W. J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*, 72(4), 1063-1081. doi: 10.1152/physrev.1992.72.4.1063
- White, J. P., Baltgalvis, K. A., Puppa, M. J., Sato, S., Baynes, J. W., & Carson, J. A. (2011). Muscle oxidative capacity during IL-6-dependent cancer cachexia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(2), R201-R211. doi: 10.1152/ajpregu.00300.2010
- Widrick, J. J., Knuth, S. T., Norenberg, K. M., Romatowski, J., Bain, J. L., Riley, D. A., . . . Costill, D. (1999). Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. *J Physiol*, 516(3), 915-930. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0915u.x
- Widrick, J. J., Knuth, S. T., Norenberg, K. M., Romatowski, J. G., Bain, J. L., Riley, D. A., . . . Fitts, R. H. (1999). Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus

muscle fibres. *J Physiol*, 516(Pt 3), 915–930. doi:
10.1111/j.1469-7793.1999.0915u.x

Yamashita-Goto, K., Okuyama, R., Honda, M., Kawasaki, K., Fujita, K., Yamada, T., . . . Yoshioka, T. (2001). Maximal and submaximal forces of slow fibers in human soleus after bed rest. *Journal of Applied Physiology*, 91(1), 417–424. doi:
10.1152/jappl.2001.91.1.417

Zange, J., Müller, K., Schuber, M., Wackerhage, H., Hoffmann, U., Günther, R., . . . Bacharev, A. (1997). Changes in calf muscle performance, energy metabolism, and muscle volume caused by long term stay on space station MIR. *International journal of sports medicine*, 18(S 4), S308–S309. doi:
10.1055/s-2007-972738

Abstract

The Effect of Resistance Ladder Climbing Exercise on Muscle Recovery and Heat Shock Protein 72 Expression after Hindlimb Unloading in Rat

Hoyoun Kim

Health and Exercise Science

Department of Physical Education

The Graduate School

Seoul National University

Introduction : It is important to recover effectively from skeletal muscle atrophy. Therefore, it has been widely studied to promote effective recovery from atrophy induced by disuse. Hindlimb unloading in rats is a model that reproduces muscle atrophy in animals due to muscle disuse. The resistance ladder climbing exercise is the most effective way to induce muscle hypertrophy against muscle atrophy by short-term training. In this study, muscle recovery and HSP72 expression levels were compared in muscle by muscle gravity reloading and resistance exercise for 4 weeks in the Sprague-Dawley rats.

Method : 9-week-old male Sprague-Dawley rats were divided into following groups; control group(CON), reloading after hindlimb unloading group(HRE), and resistance ladder climbing exercise group after hindlimb unloading group(HEX). In order to confirm the recovery effect by muscle fiber type, gravity reloading and resistive ladder exercise were performed for 4 weeks. Muscle wet weight was measured by phenotypic analysis of Soleus and Gastrocnemius. Troponin I-SS, Troponin I-FS, atrophy-related factors(Atrogin-1, Murf-1), inflammation-related factors(TNF- α , IL-6), and mRNA and protein levels of HSP72 were analyzed by real-time PCR and western blot analysis. All data were analyzed by using SPSS 22.0 statistical program. The descriptive statistics were used to determine the mean and standard error for each item, and an independent t-test and one-way ANOVA were conducted to verify the difference between groups. All statistical significance levels were set at $P < .05$.

Results : Muscle wet weight was decreased significantly in Soleus and Gastrocnemius after 2 week Hindlimb unloading. The grip strength of the 4 week resistance ladder climbing exercise(HEX) group was significantly higher than that of the two groups. Analysis of Troponin I-SS and Troponin I-FS proteins in Soleus and Gastrocnemius showed that Troponin I-FS was significantly increased only in the soleus HRE group. Atrogin-1 mRNA levels of Soleus were significantly increased in the HRE and HEX groups compared to the CON group. TNF- α was significantly increased in the HRE group and IL-6 was significantly increased in the HEX group. The mRNA levels of Atrogin-1 and Murf-1 of Gastrocnemius were significantly lower in the intervention group than in the CON group. The expression

level of HSP72 was significantly increased in Soleus compared to CON group in both HRE and HEX groups.

Conclusion : Although gravity reloading and resistance ladder climbing exercises had positive effects on muscle recovery, there was no significant difference between the interventions at the molecular level. Further studies on mechanism is required and at the same time, we recommend to apply the appropriate intervention period to identify differences in muscle recovery and HSP72 expression levels.

Keywords : Hindlimb unloading, Reloading, Atrophy, Resistance exercise, Muscle recovery, HSP72

Student Number : 2016-21623



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

체육학석사 학위논문

쥐의 뒷다리 부유 후
저항성 사다리 운동이 근육에 따라
근회복과 Heat Shock Protein 72
발현에 미치는 영향

The Effect of Resistance Ladder Climbing
Exercise on Muscle Recovery
and Heat Shock Protein 72 Expression
after Hindlimb Unloading in Rat

2018년 2월

서울대학교 대학원

체 육 교 육 과

김 호 연

쥐의 뒷다리 부유 후
저항성 사다리 운동이 근육에 따라
근회복과 Heat Shock Protein 72
발현에 미치는 영향

지도교수 송 욱

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2017년 12월

서울대학교 대학원
체육교육과
김 호 연

김호연의 석사 학위논문을 인준함
2017년 12월

위 원 장 _____ 이 용 호 (인)

부위원장 _____ 문 효 열 (인)

위 원 _____ 송 욱 (인)

초 록

골격근의 활동이 제한되어 근위축(Atrophy)이 유발될 경우 효과적으로 회복을 하는 것이 중요하므로 이와 관련된 방법과 물질들이 계속해서 연구되고 있다. 쥐의 뒷다리 부유(Hindlimb unloading)는 근육의 불용으로 인해 사람에게 나타나는 근위축을 재현하는 모델이다. 반면 저항성 사다리 운동은 단기간의 트레이닝으로 근위축에 대항하여 근비대(Hypertrophy)를 유발하는 가장 효과적인 방법이다. 따라서 본 연구에서는 Sprague-Dawley rat을 대상으로 2주간의 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유발하고, 4주간의 중력재부하와 저항성운동을 실시하여 근육별로 근육의 회복 정도와 HSP72의 발현량을 비교하였다.

9주령의 수컷 Sprague-Dawley rat을 대상으로 대조군(CON)과 뒷다리 부유 후 중력재부하(HRE) 그룹, 뒷다리 부유 후 저항성 사다리운동(HEX) 그룹으로 나누어 각 그룹 당 7마리씩 배정하였다. 근위축을 유발하기 위해 2주간 뒷다리부유를 실시하였다. 그 후 회복효과를 근섬유 형태별로 확인하기 위해 중력재부하(Reloading)와 저항성 사다리 운동을 4주간 실시하여 가자미근(Soleus)과 비복근(Gastrocnemius)을 분석하였다. 표현형 분석을 위해 근육 무게(Wet weight)를 측정하고 Troponin I-SS, Troponin I-FS, 근위축 관련인자(Atrogin-1, Murf-1), 염증관련인자(TNF- α , IL-6), HSP72의 mRNA와 단백질 발현량을 각각 Real-time PCR과 western blot을 통해 분석하였다. 본 연구의 자료는 SPSS 22.0 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 기술통계를 통해 각 항목별 평균과 표준오차를 구하고 집단 간 차이의 검증은 Independent t-test와 one-way ANOVA를 실시하였다. 모든 통계의 유의 수준은 $P < .05$ 로 설정하였다.

2주간의 뒷다리 부유를 실시한 결과 가자미근과 비복근의 근 무게가 유의하게 감소하였다. 4주간 저항성 사다리 운동을 실시한 그룹의 Grip strength가 두 그룹의 비해 유의하게 증가하였다. 가자미근과

비복근에서 Troponin I-SS와 Troponin I-FS 단백질을 분석한 결과 가자미근의 HRE 그룹에서만 Troponin I-FS가 유의하게 증가 되었다. 가자미근의 Atrogin-1 mRNA level은 HRE, HEX그룹이 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였고 TNF- α 는 HRE그룹에서, IL-6는 HEX그룹에서만 유의하게 증가하였다. 비복근의 Atrogin-1과 Murf-1의 mRNA 발현량은 중재 그룹 모두 CON 그룹에 비하여 유의하게 감소하였다. HSP72의 단백질 발현량은 가자미근에서 HRE, HEX 그룹 모두 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였다.

중력재부하와 저항성 사다리 운동이 근육에 회복에 있어서 긍정적인 효과를 나타냈지만 분자수준에서 중재 간에 큰 차이가 나타나지 않았으므로 근회복과 HSP72 발현량의 차이를 확인하기 위해 추후 연구에서 기전 연구와 함께 적절한 중재기간을 적용하여 연구될 필요가 있다.

주요어 : 뒷다리 부유, 근위축, 중력재부하, 저항성 운동, 근회복, HSP72
학 번 : 2016-21623

목 차

I. 서론	1
1. 연구의 필요성	1
2. 연구의 목적	4
3. 연구의 가설	4
II. 이론적 배경	5
1. 쥐의 뒷다리 부유 모델	5
2. 저항성 사다리 운동	8
3. Heat shock protein	9
III. 연구 방법	11
1. 실험동물	11
2. 연구 설계	12
3. 뒷다리 부유 처치 프로토콜	14
4. 운동 프로토콜	15
5. Grip strength 측정	16
6. 조직 적출	17
7. Real-time PCR	18
8. 단백질 추출 및 정량	19
9. SDS-PAGE	20
10. Western blot	21
11. 자료처리	22

IV. 연구 결과	23
1. 2주간의 뒷다리 부유 후 근육별 무게변화	23
2. 4주간의 중재 후 근육별 무게 변화	24
3. Grip strength	25
4. 4주간의 중재 후 근육별 근섬유 형태 변화	27
5. 근위축 및 염증 관련 인자의 mRNA발현량	29
6. HSP72 발현량	31
 V. 논 의	 33
 참고문헌	 38
Abstract	53

표 목 차

Table 1. Research group	11
Table 2. Exercise protocol	15
Table 3. Primer sequence	18
Table 4. Grip strength	26

그 립 목 차

Figure 1. Research design	13
Figure 2. Changes in muscle weight after 2 weeks hindlimb unloading	23
Figure 3. Changes in muscle weight after 2 weeks unloading and during 4 weeks reloading, 4 weeks resistance exercise	24
Figure 4. Changes in hindlimb grip strength	25
Figure 5. Expression of Troponin protein isoforms	28
Figure 6. Expression of atrophy and inflammation relative markers mRNA level	30
Figure 7. Expression of HSP72 protein and mRNA	32

I. 서론

1. 연구의 필요성

골격근량의 유지와 증대는 인간의 건강한 삶을 위해 매우 중요하다. 이러한 골격근 양을 효과적으로 유지하기 위해 골격근 세포의 성장과 합성을 위한 운동요법이나 식이요법 등 다양한 방법이 연구되고 있다(Goldberg, 1968, Vandeburgh & Kaufman, 1979, Baldwin, Valdez, Herrick, MacIntosh, & Roy, 1982, Esser, 2008). 우주 비행으로 인해 무중력 환경에 있는 우주비행사나 부상 또는 투병으로 인한 장기간의 침상생활로 골격근의 활동이 제한되는 환자의 경우 감소된 활동량으로 인해 근육의 무게가 손실되고 근력이 약화 된다(Armstrong, Warren, & Warren, 1991; Widrick et al., 1999). 근기능의 저하는 자세유지, 호흡 등 생체 활동의 기본적인 항상성을 떨어뜨리고 부상과 질병 상황에 노출되기 쉽게 한다. 따라서 활동의 제한으로 인한 골격근의 형태학적, 생리학적 변화에 대해 많은 연구가 진행되고 있으며 부상을 최소화 하면서 효과적으로 회복, 재생, 재활을 위한 이론적 방법들이 연구되고 있다(Appell, Duarte, & Soares, 1990).

근위축은 단백질 분해(Degradation) 비율을 증가시키고 단백질 합성(Synthesis)을 감소시킴으로서 손상된 골격근의 재생능력이 저하되는 것을 말한다(Naito, Powers, Demirel, & Aoki, 2001; Aragno et al., 2004). 운동은 이러한 문제를 해결하기 위한 효과적인 방법으로 알려져 있다. 운동을 통해 골격근 섬유에서 근위축 인자를 방어하고 근섬유의 성장 및 비대를 유도하는 관련 인자들을 활성화 시킬 수 있다(Seward, Haney, Rudnicki, & Swoap, 2001; Talmadge, 2000).

쥐의 뒷다리 부유 모델은 우주비행사나 침상생활 환자에게 나타나는 근육량 감소, 근섬유의 크기 감소, 근력 감소 등의 근위축 현상을

유사하게 유발할 수 있어 널리 사용되는 방법이다(Akima et al., 2000; Rittweger et al., 2005; Zange et al., 1997; Yamashita-Goto et al., 2001; Morey-Holton & Wronski, 1982; Musacchia & Fagette, 1997; Hanson, Stodieck, Cannon, Simske, & Ferguson, 2010). 뒷다리 부유는 쥐의 근육량과 근단면적을 감소시키고 근원섬유 단백질을 감소시키는 등 근위축을 유발한다(Vermaelen et al., 2005; Wang et al., 2006). 근위축은 근섬유 속 근핵과 위성세포 수를 감소시키고 미토콘드리아의 활성성을 저하시킨다(D. Thomason, Herrick, Surdyka, & Baldwin, 1987; Vermaelen et al., 2005; Wang et al., 2006). 또한 Atrogin-1, Murf-1과 같은 근위축 관련 인자들이 증가하는 것으로 나타났다(Maki et al., 2012). 뒷다리 부유에 의한 근위축은 특히 가자미근(Soleus)에서 큰 반응을 보이며 지근섬유(Slow twitch muscle)의 손실이 가장 크게 나타난다(Fitts, Metzger, Riley, & Unsworth, 1986, Thomason, Herrick, Surdyka, & Baldwin, 1987, D. B. Thomason & Booth, 1990).

저하된 근 기능과 골격근의 손실을 효과적으로 회복, 재생을 위해서는 운동요법이 가장 효과적이라고 알려져 있다(Bodine et al., 2001). 점증적 부하의 저항성 운동은 근비대를 일으키고 근위축을 감소시켜 신체적 능력을 향상시킬 수 있다. 단기간의 운동으로도 그 효과를 확인할 수 있으며 사람과 동물연구에서 모두 그 효과를 검증하였다(Adams, Cheng, Haddad, & Baldwin, 2004; Fry, 2004; Hather, Tesch, Buchanan, & Dudley, 1991; Tesch, Ekberg, Lindquist, & Trieschmann, 2004). 쥐를 대상으로 저항성 운동을 재현하기 위해 1980년대에 사다리 운동이 디자인 되었다(Herbert, Roy, & Edgerton, 1988). 사다리 운동을 통한 근비대와 근력 증가의 효과가 확인 되어 많은 기전 연구가 선행되었다(Herbert, Roy, & Edgerton, 1988; Jung et al., 2015; Herbert, Roy, & Edgerton, 1988; Hornberger Jr & Farrar, 2004). 저항성 운동은 근섬유 지름 증가, 근력 증가 등 근단백질 재합성으로 인한 근비대를 유발하므로 근위축으로 인해 발생하는 근손실을 효과적으로 보호 할 수 있다(Jung et al., 2015; Herbert, Roy, & Edgerton, 1988; Hornberger Jr

& Farrar, 2004).

운동은 근수축을 통해 이루어지므로 이에 대한 반응으로 열을 발생시킨다. 이러한 스트레스에 대항하여 골격근에서는 HSP72 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다(Snoeckx, Cornelussen, Van Nieuwenhoven, Reneman, & Van der Vusse, 2001; Murlasits et al., 2006; Locke, Noble, & Atkinson, 1990; Salo, Donovan, & Davies, 1991). 선행연구 결과에 따르면 HSP72가 근육의 상해와 근위축으로부터 방어적 역할을 한다고 보고되고 있다. 유전자 변형을 통해 HSP72를 과발현 시킨 쥐는 근육의 손상 후 근력의 감소가 더 적게 나타났으며 이러한 결과는 회복을 더 빠르게 할 것이라고 기대할 수 있다(McArdle, Dillmann, Mestril, Faulkner, & Jackson, 2004). 하지만 근위축으로부터 보호적으로 대응되는 기전과 근육 내 HSP72의 기능이 분명하게 밝혀져 있지 않으므로 보다 정확한 연구가 요구되며, 근위축에 대항하여 저항성 운동을 실시하였을 때 발현되는 HSP가 회복에 직접적인 영향을 미칠 수 있는지 연구가 필요하다.

뒷다리 부유로 인한 근위축의 생리학적 기전 연구와 뒷다리 부유 후 재부하(Reloading) 또는 유산소 운동의 처치는 연구되어 왔으나 뒷다리 부유 후 저항성 운동으로 인한 근위축 방어를 확인한 연구는 부족하다. 또한 선행 연구에서 HSP가 근육의 손상이나 근위축에 방어적인 역할을 한다는 것과 관련된 결과가 제시되고 있기 때문에 쥐의 뒷다리 부유로 골격근 손실을 유도하여 일반 처치와 운동 처치를 통해 HSP의 발현량의 변화 양상을 살펴 볼 필요가 있다.

2. 연구의 목적

본 연구의 목적은 Sprague-Dawley 쥐를 대상으로 2주간의 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유발하고, 4주간의 중력재부하와 저항성 운동을 실시하여 근섬유 형태별로 근육의 회복 정도와 HSP72 발현량을 비교하는 것이다.

3. 연구의 가설

본 연구의 목적을 규명하기 위해 다음과 같은 연구 가설을 설정하였다.

첫째, 2주간의 뒷다리 부유 후 4주간의 중력재부하와 저항성 운동 수행 후 근육의 회복과 HSP72 발현량은 그룹에 따라 차이를 나타낼 것이다.

둘째, 2주간의 뒷다리 부유 후 4주간의 중력재부하와 저항성 운동 수행 후 근육의 회복과 HSP72 발현량은 근육에 따라 차이를 나타낼 것이다.

II. 이론적 배경

1. 쥐의 뒷다리 부유 모델

쥐의 뒷다리 부유 모델은 무중력 환경에 있는 우주비행사나 부상 또는 투병으로 장기간 침상 생활을 하는 사람들의 근육 불용(Disuse)을 재현한 모델이다. 골격근은 항상성 유지를 위해 골격근 내 활동이 증가하거나 감소하는 등 환경적 변화에 쉽게 적응하여 형태학적, 기능적으로 변화를 일으킨다. 우주비행사가 무중력 환경에 노출되거나, 골격근계 손상 또는 투병으로 오랜 침상생활을 하게 될 경우 부동(Immobilization)으로 인해 근육의 손실을 야기한다(LeBlanc et al., 2000; Grosset & Onambele Pearson, 2008; Rittweger et al., 2005; Zange et al., 1997). 8일간의 우주비행으로 무중력 환경에 노출되었을 때 근육량이 6-20% 감소되고 6개월간의 우주비행을 마치고 돌아온 경우 발바닥 굴근(Plantar flexor muscle)의 최대 근력(Maximal voluntary contraction, MVC)이 20-48% 감소된 것으로 나타났다(Akima et al., 2000; Rittweger et al., 2005; Zange et al., 1997). 이는 동물의 뒷다리 부유, 환자의 오랜 침상 생활 등의 불용(Disuse)로 인하여 나타나는 현상으로 동물과 인간 모두에게서 이와 같이 보고되고 있다(Yoshinobu Ohira et al., 2000; Y Ohira et al., 1999; Yamashita-Goto et al., 2001). 2개월, 4개월 간 병상에 오래 누워있던 환자의 경우 각각 8%, 36%의 근섬유 지름(Mean fiber diameter)이 감소된 것으로 나타났다(Yamashita-Goto et al., 2001). 이러한 근위축을 재현하기 위해 설치류에서 쥐의 뒷다리 부유 모델이 널리 사용되고 있다(Morey-Holton & Wronski, 1982; Musacchia & Fagette, 1997; Hanson, Stodieck, Cannon, Simske, & Ferguson, 2010).

쥐를 통한 뒷다리 부유는 주로 골격근량의 감소를 유발하고 근육의 기능을 저하시키는 것으로 보고되고 있다(T. Ohira et al., 2011; Leonard, Leach, & Rambaut, 1983). 이러한 현상은 단백질 분해(Degradation) 비율을 증가시키고 단백질 합성(Synthesis)을 감소시킴으로서 나타난다. 4-8일 단기간의 뒷다리 부유만으로도 근육량이 급격하게 감소하고 근섬유의 횡단면적(CSA, Cross sectional area)과 근원섬유 단백질을 감소시킨다(Vermaelen et al., 2005; Wang et al., 2006). 또한 16일간 뒷다리 부유 후 가자미근(Soleus)의 단일 근섬유 속 근핵과 위성세포가 감소하는 것을 확인하였다(D. Thomason, Herrick, Surdyka, & Baldwin, 1987; Vermaelen et al., 2005; Wang et al., 2006). 이러한 결과들을 통해 뒷다리 부유로 인한 근위축이 위성세포 수와 미토콘드리아의 활동성을 저하시켜 근육의 기능을 감소시키는 것을 알 수 있다(Wang et al., 2006; Darr & Schultz, 1989). 14일 간의 뒷다리 부유 결과 정상 쥐와 비교하여 가자미근이 25-34%가 감소된 것을 확인 하였고 근육의 횡단면적(CSA)을 관찰한 결과 지근섬유(Slow twitch muscle fibers)가 속근섬유(Fast-twitch muscle fibers)에 비해 더 크게 감소한 것을 확인하였다(Ohira et al., 1992). 뒷다리 부유에 의한 골격근 위축은 특히 지근섬유의 감소가 두드러지게 나타나며 가자미근에서 큰 감소를 나타낸다(Fitts, Metzger, Riley, & Unsworth, 1986, Thomason, Herrick, Surdyka, & Baldwin, 1987, D. B. Thomason & Booth, 1990).

환자나 우주 비행사가 근육의 불용(Disuse)으로 인한 골격근의 단백질분해(Degradation)를 방지하는 것은 일상생활로 복귀하고 지구에 돌아와 건강하게 살아가기 위해 중요한 부분이다. 유산소 운동과 저항성 운동이 오랜 침상생활로 인해 발생하는 외측광근(Vastus lateralis)과 가자미근(Soleus)의 감소를 억제하는 효과를 확인하였고, 근육과 뼈의 감소 또한 운동을 통해서 예방할 수 있다고 발표하였다(Trappe et al., 2008; Trappe, Creer, Slivka, Minchev, & Trappe, 2007; Yamashita-Goto et al., 2001). 쥐의 뒷다리 부유를 통한 근위축을

유발한 선행연구결과에서도 운동이 효과적으로 근육량의 감소를 약화시키는 것을 확인 하였으며 다양한 운동자극을 통해 근위축을 약화시키거나 방지하는 효과를 검증하고 있다(Herbert, Roy, & Edgerton, 1988; D'Aunno, Thomason, & Booth, 1990; Kirby, Ryan, & Booth, 1992; Leterme & Falempin, 1994; Hurst & Fitts, 2003; Dupont-Versteegden, Fluckey, Knox, Gaddy, & Peterson, 2006; Adams, Haddad, Bodell, Tran, & Baldwin, 2007).

2. 저항성 사다리 운동

저항성 운동은 사람과 동물 모두에게 근비대(Hypertrophy)를 효과적으로 일으킬 수 있는 운동방법으로, 단기간인 2-3주의 트레이닝 프로그램으로도 근육량과 근육의 단백질량을 증가시킬 수 있다(Adams, Cheng, Haddad, & Baldwin, 2004; Fry, 2004; Hather, Tesch, Buchanan, & Dudley, 1991; Tesch, Ekberg, Lindquist, & Trieschmann, 2004). 점증적 부하의 저항성 운동은 근비대와 더불어 근력을 증가시키고 근위축(Weakness)을 감소시켜 신체적 능력을 향상시킨다(Seo et al., 2014). 쥐의 사다리 운동은 인간의 저항성 운동을 가장 유사한 형태로 쥐에게 적용할 수 있으며 음식이나 물을 통한 보상, 결핍 없이 비교적 적은 스트레스를 통해 운동 상황을 반영 할 수 있는 장점을 가지고 있다(Seo et al., 2014).

인간의 저항성 운동을 대변하는 쥐의 사다리 운동은 1980년대에 처음 디자인 되었다. 85도 기울어진 1m가량의 사다리를 제작하였고 쥐의 몸무게의 75% 정도의 무게의 추를 꼬리에 매달아 쥐의 사다리 운동을 시행하였다(Herbert, Roy, & Edgerton, 1988). 8주간의 저항성 사다리 운동 후 대퇴사두근(Quadriceps)의 근섬유 지름이 20% 증가하였고, 7일간의 저항성 운동을 통해 가자미근(Soleus)의 힘(Force)이 증가하였다(Jung et al., 2015; Herbert, Roy, & Edgerton, 1988). 또한 8주간의 사다리 운동 결과 최대로 무게를 들 수 있는 능력이 약 2.8배 증가하였고, 장족무지굴근(Flexor Halux Longus, FHL)에서 23%의 근비대가 일어난 것을 통해 사다리 운동의 적용 가능성을 확인하였다(Hornberger Jr & Farrar, 2004).

3. Heat shock protein

Heat shock protein(HSP)은 분자적 샤프론(Chaperone)으로서 번역(Translation)이 일어나는 단백질 구조형성 초기에 중요한 역할을 한다. HSP는 다양한 스트레스에 대항하여 세포를 보호하고 생리학적으로 중요한 역할을 하는 물질이다. 이는 성장기의 신체에서 아미노산 배열의 접힘(Folding)을 유도하고 손상된 단백질의 재생을 촉진하는 기능을 가지고 있다(Locke, 1997). HSP는 분자량에 따라서 구분하며 그중 HSP70 family로부터 유도되는 HSP72가 골격근과 관련하여 가장 흥미롭게 연구되고 있다(Knowlton, 1995; Naito, Powers, Demirel, & Aoki, 2001).

HSP72는 고열, 고체온, 저산소증, 세포 손상 등의 치명적인 스트레스로부터 대항하여 보호 역할을 하며 근수축을 통한 근육에 주는 스트레스, 즉 운동이 골격근에서 HSP72의 발현을 유도한다고 보고되고 있다(Snoeckx, Cornelussen, Van Nieuwenhoven, Reneman, & Van der Vusse, 2001; Murlasits et al., 2006; Locke, Noble, & Atkinson, 1990; Salo, Donovan, & Davies, 1991). 이러한 HSP는 골격근 세포에서 근원섬유를 유지시키고 세포 단백질의 조립을 돕는다(Benjamin, Shelton, Garry, & Richardson, 1997; Golenhofen et al., 1998; Neufer et al., 1996). 또한 스트레스가 없는 정상상태에서 산화능력이 높은 지근섬유에 많이 함유되어 중요한 역할을 한다(Locke, Atkinson, Tanguay, & Noble, 1994; Locke, Noble, & Atkinson, 1991). 노화된 세포일수록 열자극(Heat stress)이 감소되고 이는 세포의 항상성을 감소시킨다고 보고되고 있다(Fargnoli, Kunisada, Fornace, Schneider, & Holbrook, 1990; Heydari, Takahashi, Gutschmann, You, & Richardson, 1994; Liu, Lee, Manalo, & Huang, 1996; Powers, Quindry, & Hamilton, 2004). 노화 동물 모델을 통해 확인한 결과 심근을 비롯하여 여러 조직에서 열충격반응(Heat shock response)이 약화된다고 한다(McArdle, Dillmann, Mestrlil, Faulkner, & Jackson, 2004). 하지만 Locke(2000)의

연구 결과에 의하면 노화 동물의 골격근이 보유하고 있는 HSP72 축적 수용 능력은 열충격(Heat stress)에 대해 일반 성체(Adult mice)와 유사한 정도의 축적 수용 능력을 가지고 있는 것으로 나타났으며, Naito et al.(2001)의 연구에서 유산소 훈련을 통해 발현된 HSP72가 유사하게 증가된 것을 확인하였다.

골격근 내에서의 HSP72의 기능이 분명하게 밝혀져 있지 않지만 많은 연구에서 HSP72가 근육의 상해와 근위축으로부터 방어적으로 역할을 한다는 결과를 나타냈다(Garramone Jr, Winters, Das, & Deckers, 1994; Naito et al., 2000). 반대로 근육의 불용(Disuse)로 인해 근육량이 감소할 때 HSP72 발현량이 감소하는 것을 관찰 하였으며 HSP72와 근육에서의 단백질 저하(Degradation)와 관계가 있을 것으로 보여 진다(Ku, Yang, Menon, & Thomason, 1995). Lengthening contraction을 통해 근육의 손상(Muscle damage)을 준 후 3일 뒤 힘(Force)을 측정하였을 때 HSP72를 20배가량 과발현 시킨 쥐는 정상 쥐와 비교하여 힘(Force)의 감소가 63% 더 낮게 나타났다(McArdle, Dillmann, Mestril, Faulkner, & Jackson, 2004). 이는 완전한 회복을 위해 일반적으로 14일이 소요되는 것을 더 빠르게 회복할 수 있는 효과를 기대할 수 있으며 노화 쥐에서도 유사한 효과를 얻을 수 있다(McArdle, Dillmann, Mestril, Faulkner, & Jackson, 2004). 또한 뒷다리 부유 모델에서 관찰한 결과 HSP72가 감소하여 근육에서 나타나는 단백질 분해(Degradation)와 관계가 있을 것으로 보이며 9주간의 뒷다리 부유 후 8주간의 중력재부하가 가해졌을 시 2주, 4주차 모두 HSP72 발현량의 증가가 나타났으므로 이를 통하여 운동 중재 후 더 큰 효과가 나타날 것으로 기대할 수 있다(Oishi et al., 2003; Fujino et al., 2009). 이러한 결과들은 HSP72가 근육의 크기와 단백질 분해와 손상으로 인한 힘(Force)의 감소로부터 방어적인 역할을 하는 것으로 기대할 수 있다.

Ⅲ. 연구 방법

1. 실험동물

본 연구의 실험동물은 9주령의 수컷 Sprague-Dawley rat으로 무작위 추출을 통해 총 21마리의 쥐를 CON 그룹(n=7), HRE 그룹(n=7), HEX 그룹(n=7), 3개의 그룹으로 나누어 배정하였다. 본 실험동물은 서울대학교 수의과 대학 실험동물실에서 멸균된 물과 사료를 제공하고 온도 22°C, 습도 60%, 밤낮 주기(12시간 점등/12시간 소등)를 유지하여 적합한 환경에서 사육되었다. CON group의 쥐는 30cm x 30cm의 케이지에 각각 한 마리씩 사육 하고, 뒷다리 부유 그룹(HRE, HEX)의 케이지는 길이 60cm x 폭 30cm x 높이 40cm 에 각각 한 마리씩 사육하였다.

Table 1. Research group

Group	Intervention	Duration
CON (n=7)	Weight bearing control	6 weeks
HRE (n=7)	Hindlimb unloading followed by weight bearing spontaneous recovery	2 weeks+4 weeks
HEX (n=7)	Hindlimb unloading followed by Ladder climbing exercise	2 weeks+4 weeks

2. 연구 설계

본 연구는 9주령의 수컷 Sprague-Dawley rat을 대상으로 2주간의 뒷다리 부유(Hindlimb unloading)를 한 후 중력재부하(Reloading)와 저항성 운동으로 인한 회복 효과를 근섬유 형태별로 확인하고자 하였다. 대조군(CON, control group), 뒷다리 부유 후 중력재부하 그룹(HRE, Hindlimb unloading and reloading), 뒷다리 부유 후 저항성 운동 그룹(HEX, Hindlimb unloading and resistance exercise)에 각각 7마리씩 배정하여 실험이 진행되었다. 모든 쥐는 일주일간의 적응 기간을 거친 후 HRE, HEX 그룹의 쥐꼬리에 테이핑 하여 뒷다리 부유를 처치하였다. 중재 기간 동안 모든 쥐는 자유롭게 먹이를 섭취할 수 있도록 하였다. 2주간의 뒷다리 부유 후 4주간의 중력재부하와 저항성 운동의 효과를 확인하기 위하여 악력측정을 통해 근기능을 평가하였다. 2주간의 뒷다리 부유 처치 전과 후 4주간의 중재 후 총 3회에 걸쳐 뒷다리 악력 측정을 시행하였다.

본격적 중재가 시작되기 전에 한주간의 적응기간을 거쳐 뒷다리 부유 전용 케이지와 저항성 운동에 익숙해지도록 하였다. 일주일의 적응기를 거친 후 HRE, HEX 그룹은 꼬리에 테이핑을 하여 도르래를 이용해 전용 케이지와 연결하였다. 뒷다리가 지면에 닿지 않고 앞다리만으로 자유롭게 이동 할 수 있도록 처치하였다. CON 그룹은 일반 케이지에서 사육 되었다.

2주간의 뒷다리 부유 처치 후 HRE 그룹은 부유 처치를 시행했던 뒷다리를 정상상태와 같이 지면으로 내려 중력재부하(체중부하)를 시행하였고, HEX 그룹은 점증적으로 중량을 증가시키는 저항성 사다리 운동을 각각 4주간 시행하였다. 그 후 48시간 뒤 부검을 진행 하였다.

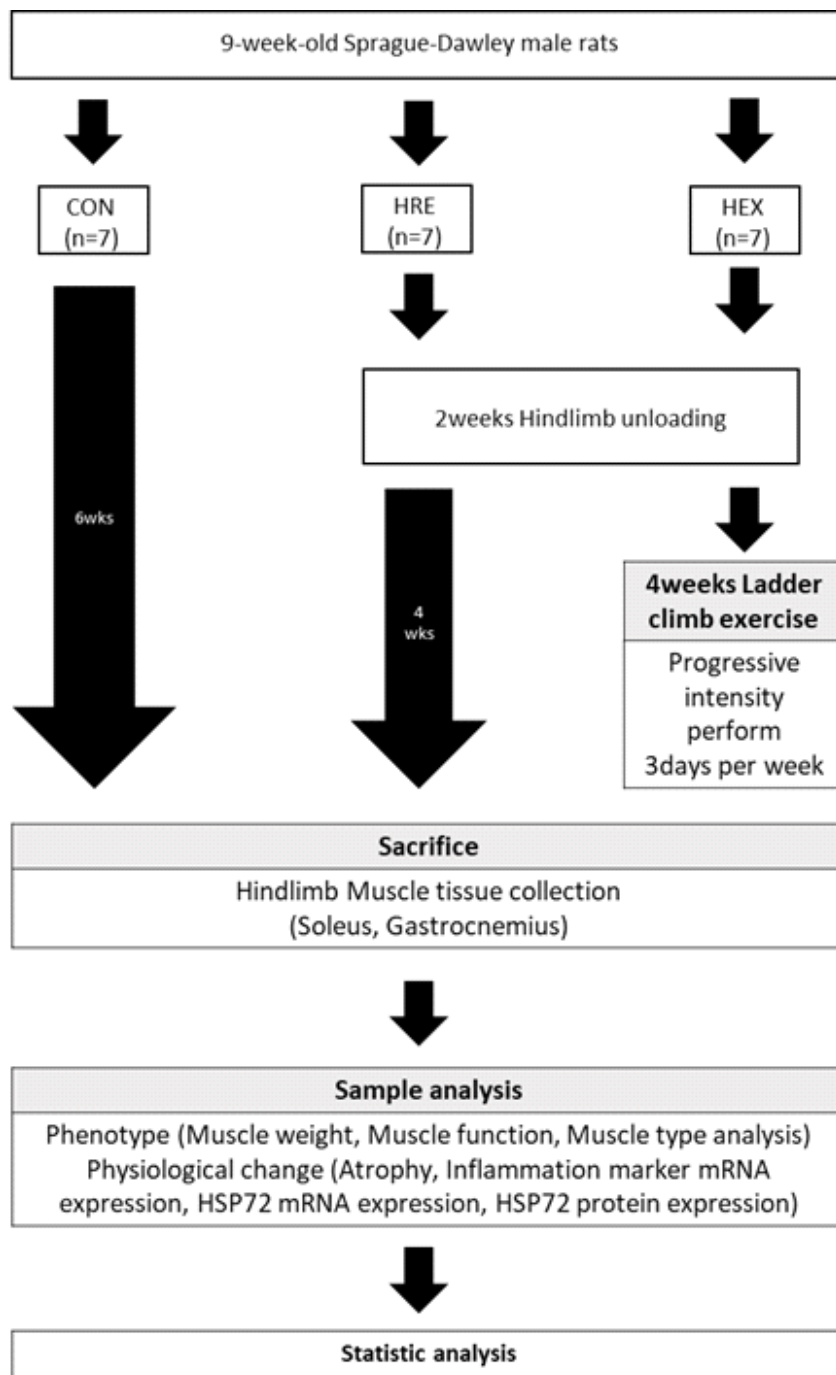


Figure 1. Research design

3. 뒷다리 부유 처치 프로토콜

쥐의 뒷다리를 부유하기 위해 꼬리를 테이핑 하여 도르래에 연결 할 수 있도록 하였다. 키네시오 테이프를 이용하여 꼬리에 부착, 고정하고 도르래에 끼울 수 있도록 고리형태로 만들어 연결 하였다. 길이 60cm x 폭 30cm x 높이 40cm 아크릴로 특수 제작된 케이지 위에 도르래를 끼워 넣은 철근을 고정하여 부유의 높이를 설정할 수 있도록 하고, 고리에 연결 된 꼬리는 지면에 뒷다리가 닿지 않는 높이에 고정하여 앞다리로만 자유롭게 움직일 수 있게 하였다. 철근에 끼워진 도르래는 360도 회전이 가능하도록 제작하여 식이 섭취 등의 움직임을 자유롭게 하였다.

4. 운동 프로토콜

HEX 그룹을 대상으로 2주간의 뒷다리 부유 처치 후 점증적 부하 증가를 기반으로 한 저항성 사다리 오르기 운동을 실시하였다. 사다리 운동은 4주간 주 3회 실시하였으며 85° 기울어진 간격 2cm, 폭 0.25m, 길이 1m인 사다리에서 시행하였다. 적응을 위해 처음 일주일간 낮은 강도의 부하로 사다리운동을 시행한 후 꼬리에 추를 매달아 점증적으로 부하를 증가시켜 운동을 실시하였다. 하루 한 번의 운동 수행은 총 10회를 반복하며 2주차부터 해당 무게 성공 시 매 회마다 30g씩 증가시켜 점증적으로 부하가 증가하도록 하였다.

Table 2. Exercise protocol

	Exercise period						
Week	1st			2nd	3rd	4th	
Load	0 g	50% of BW	60% of BW	50% of BW	70% of BW	90% of BW	
Repetitions				10 repetitions (Progressive increase 30g every success)			
Rest	2min, interval						
Frequency	3day / week for 4weeks (Total 12 sessions)						

5. Grip strength 측정

Grip strength는 Grip strength meter(Bioseb, France)를 사용하여 측정하였다. 뒷다리의 악력을 측정하며 측정 시 뒷발이 grasp grid를 잡도록 위치시키고 꼬리의 2분의 1 지점을 잡고 동일한 힘으로 잡아 당겨 쥐의 두 발이 grasp grid에서 떨어지기 직전 당겨지는 힘을 측정하였다. 5회를 실시하여 기록하고 힘의 단위는 g 으로 하였다. 측정 시기는 2주간의 뒷다리 부유 전과 후, 4주간의 각각의 중재 후 총 3회를 동일한 시기에 진행하였다.

6. 조직 적출

마지막 운동이 종료된 후 48시간 이후에 실험동물을 부검하였다. 부검은 12시간 절식 후에 진행하였다. 20% Urethane 용액을 복강 내 투여하여 마취하였다. 근조직은 가자미근(SOL, Soleus), 비복근(GAS, Gastrocnemius)을 적출하였다. 적출 직후 각 조직의 무게(Wet weight)를 측정하고 Cryotube에 넣어 액체 질소에 급냉각하여 -80°C에서 보관 후 분석하였다.

7. Real-time PCR

적출된 근육 조직에서 TRIzol Reagent(Invitrogen, USA)을 이용하여 Total RNA purification system(Invitrogen) 제조사의 protocol에 따라 Total RNA를 추출하였다. AccuPower CycleScript RT PreMix(Bioneer, Korea)를 이용해 역전사를 진행하고 mRNA의 cDNA는 Table 3. 에 제시된 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. SYBR Green PCR Kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염색한 후 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR Instrument system(Applied Biosystems, Cheshire, U.K.)을 이용해 상대발현량을 측정하였다. 각 mRNA 발현량은 GAPDH로 normalizing 하고 comparative Ct method $\Delta\Delta$ Ct 방법을 통해 분석하였다.

Table 3. Primer sequence

Target mRNA	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	GeneBank no.
GAPDH	ACATCATCCCTGCATCCACT	GGGAGTTGCTGTTGAAGTCA	NM_017008.4
HSP72	CGAGGGCATCGACTTCTACACG	ATCTGCGCCTTGTCAGCTTG	NM_031971.2
Atrogin-1	GAACATCATGCAGAGGCTGA	GTAGCCGGTCTTCACTGAGC	NM_133521.1
Murf-1	GCCATCCTGGACGAGAAGAAG	AGCGGCTTGCACTCAAG	NM_080903.1
IL-6	ACCACCCACAACAGACCACT	ACAGTGCATCATTCGCTGTT	NM_012589.2
TNF- α	GCCCAGACCCCTCACACTC	CCACTCCAGCTGCTCCTCT	NM_012675.3

8. 단백질 추출 및 정량

단백질 추출을 위해 RIPA Buffer 500 μ l에 조직을 넣은 뒤 Homogenizer(SONICS & MATERIALS, INC., USA)를 이용하여 lysis하였다. Buffer에 담긴 조직을 4°C에서 10분마다 30초간 vortex mixer를 이용하여 3회간 섞어주고 4°C에서 1500rpm으로 20분간 원심분리기를 이용하여 200 μ l(~400 μ l)의 상층액을 분리하였다. Pierce BCA Protein Assay kit(Thermo Scientific, Rockford, USA)를 사용하여 Microplate Reader(Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)에 넣어 흡광도를 측정한 후 40 μ g의 단백질을 정량하였다. 정량된 단백질에 SDS-PAGE loading Buffer를 넣어 95°C Heating block에서 5분간 변성(Denature) 하였다. 이후 -20°C에 보관하여 실험을 진행 하였다.

9. SDS-PAGE

SDS-PAGE를 위해 H₂ O, 30% Acrylamide, 1.5M Tris(pH 8.8), 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED를 이용하여 10%, 15%의 Seperating gel과 H₂ O, 30% Acrylamide, 1.0M Tris(pH 6.8), 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED를 이용하여 5% Stacking gel을 만들어 사용하였다. 만들어진 Gel은 1X TGS Buffer(Running buffer)에 넣어 정량된 단백질 샘플을 각 well에 20μl씩 loading하였다. Size marker는 DokDo-MARK Broad range multi color(Elpis Biotechnology, Korea)를 사용하였다. Loading이 완료된 후 60V에서 약 20분, 100V에서 약 90분 간 전기영동 하였다.

10. Western blot

전기영동이 완료된 후 1X TG Buffer(Transfer buffer)에서 mini trans-blot, 3mm CHR paper, Gel, Methyl alcohol에 적신 PVDF membrane, 3mm CHR paper의 순서로 겹쳐 Cassette에 넣어 mini trans-blot에 고정하였다. 그 후 4°C에서 60V로 180분간 Transfer를 진행하였다. Transfer가 완료된 후 1X TBS-Tween Buffer(Washing Buffer)에 희석한 5% Skim milk에 membrane을 담가 상온의 shaker 위에서 1시간동안 blocking한 후 1차 항체 GAPDH(#2118), Troponin I-SS(SC-8119), Troponin I-FS(SC-30486), HSP72(ADI-SPA-810)를 5% Skim milk에 각각 1:1000, 1:500, 1:500, 1:250으로 희석하여 4°C에서 12시간동안 shaker 위에서 반응 시켰다. 1차 항체에 반응 시킨 뒤 5% Skim milk에 각각 Rabbit(1:5000), Goat(1:5000), Goat(1:5000), Mouse(1:2000) 2차 항체를 희석하여 1시간 동안 반응 시킨 후 1X TBS-Tween Buffer로 10분간 3번 washing한 뒤, Western Blotting Detection Reagent Kit를 이용하여 band를 발색시켰다. 발색된 band는 Microchemi 4.2 System(DNR Bio-Imagin System, Jerusalem, Isreal)을 사용하여 분석하고 Image J software를 통해 결과를 도출하였다.

11. 자료 처리

본 연구의 자료는 SPSS 22.0 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다. 기술 통계를 통해 각 항목별 평균과 표준 오차를 구하고 집단 간 차이의 검증을 위해 Independent t-test와 one-way ANOVA를 실시하였다. 사후 검정은 Tukey's post hoc을 실시하여 검증하고 모든 통계의 유의 수준은 $p < .05$ 로 설정하였다.

IV. 연구 결과

1. 2주간의 뒷다리 부유 후 근육별 무게(Wet weight) 변화

본 연구에 앞서, 뒷다리 부유로 인한 근위축의 효과검증을 위해 2주간 뒷다리 부유를 실시하였다. Soleus(SOL), Gastrocnemius(GAS)의 근육 무게를 체중으로 보정하여 대조군과 비교한 결과 SOL과 GAS에서 근육 무게가 유의하게 감소하였다.

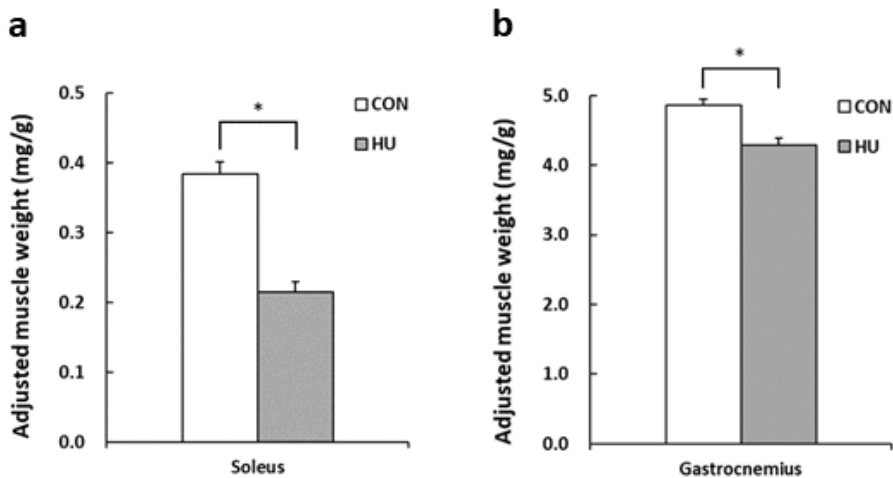


Figure 2. Changes in muscle weight after 2 weeks hindlimb unloading for soleus (a) and Gastrocnemius muscles (b).

* indicates significant change from control group ($P < .05$).

Statistical analysis was performed using Independent t-test with mean comparison in Tukey's test.

2. 4주간의 중력재부하와 저항성 운동 후 근육별 무게 변화

본 연구에서 근위축 회복 효과를 비교하기 위해 2주간의 뒷다리 부유 후 중력재부하와 저항성 운동을 각각 4주간 처치하여 SOL, GAS 각각의 무게를 체중으로 보정하여 비교하였다. 그 결과 4주간의 처치 후 SOL과 GAS 모두 근육 무게의 유의한 차이가 없었다.

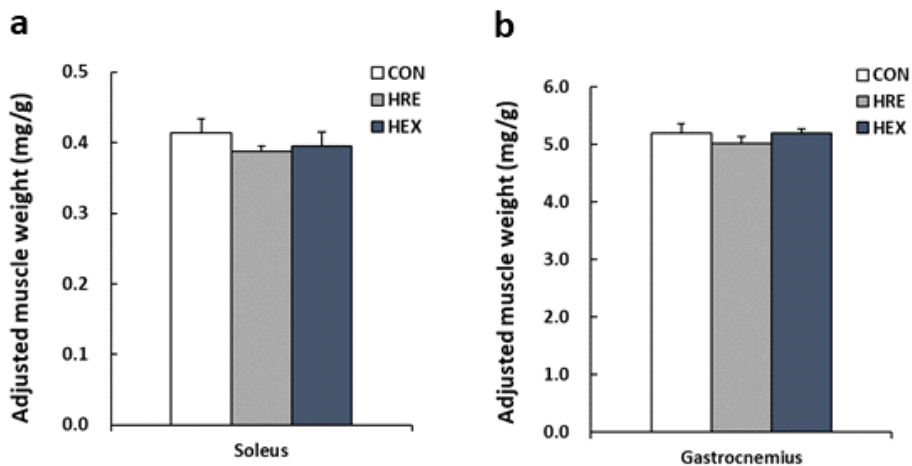


Figure 3. Changes in muscle weight after 2 weeks unloading and during 4 weeks reloading(HRE), 4 weeks resistance exercise (HEX) for soleus (a) and Gastrocnemius muscles (b). * indicates significant change from control group ($P<.05$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

3. Grip strength

본 연구에서 2주간의 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유도한 후, 4주간 중력재부하와 저항성 운동 처치로 인한 근기능의 차이를 확인하기 위해 뒷다리(Hindlimb)의 Grip strength를 측정하였다. 그 결과 2주간의 뒷다리 부유 후 근력이 감소되는 경향을 나타냈으나 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그 후 4주간 중력재부하를 시행한 그룹(HRE)과 4주간 저항성 운동을 실시한 그룹(HEX)을 6주차에서 비교한 결과 저항성 운동을 실시한 그룹에서 근기능이 유의하게 향상되었다.

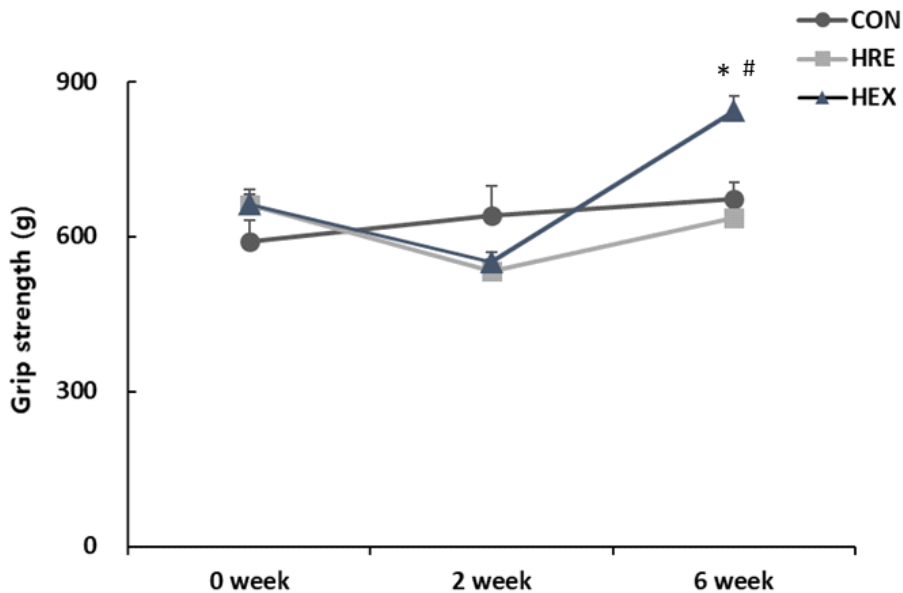


Figure 4. Changes in hindlimb grip strength 2 weeks unloading and during 4 weeks intervention in each group * $P < 0.05$ vs CON; # < 0.05 vs HRE. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

Table 4. Grip strength

	0 week	2 week	6 week
CON (n=7)	590.21±41.51(g)	640.25±58.30(g)	671.43±32.94(g)
HRE (n=7)	661.46±20.18(g)	532.08±23.99(g)	636.79±31.00(g)
HEX (n=7)	663.11±28.25(g)	550.05±20.25(g)	842.86±28.80(g)

4. 4주간의 중력재부하와 저항성 운동 후 근육별 근섬유 형태 변화

본 연구에서 근육별 근섬유 형태 변화를 확인하기 위해 SOL과 GAS에서 지근섬유를 대변하는 Troponin I-SS와 속근섬유를 대변하는 Troponin I-FS 단백질을 Western blot을 통해 분석하였다(Figure 5). 그 결과 SOL의 Troponin I-SS는 HRE 그룹 보다 HEX 그룹에서 증가된 경향을 보였으나 모든 그룹에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 5a, b). SOL의 Troponin I-FS는 CON과 HEX 그룹간의 유의한 차이는 없었으나 HRE 그룹에서 다른 두 그룹에 비하여 유의하게 증가 되었다(Figure 5a, c). GAS의 Troponin I-SS, Troponin I-FS 모두 그룹간의 유의한 차이를 나타내지 않았다(Figure 5d, e, f).

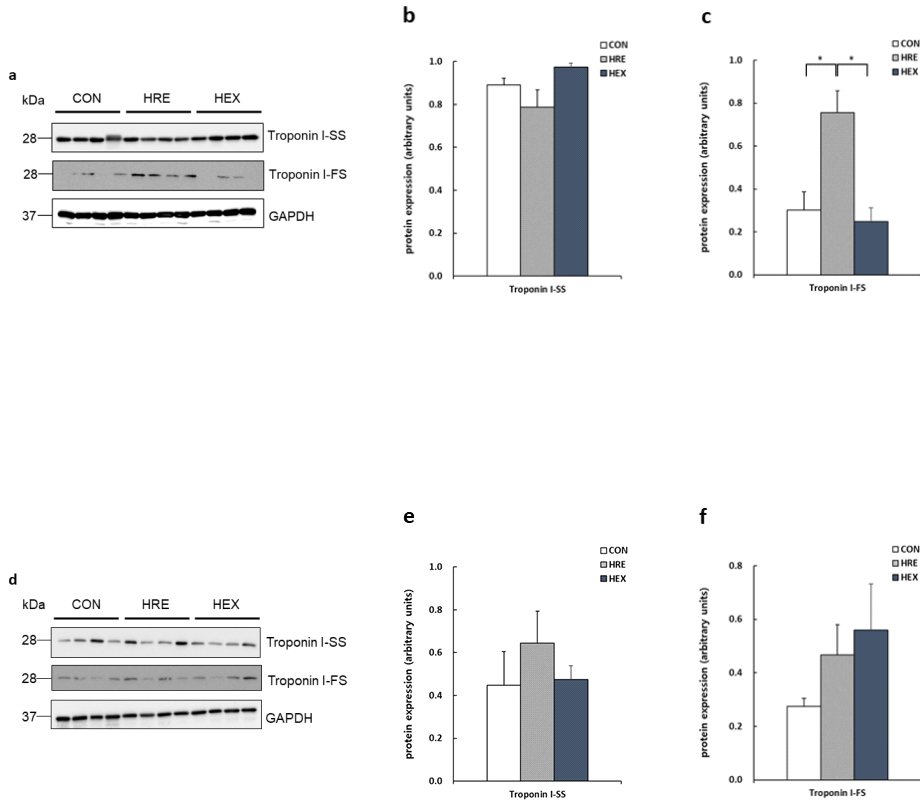


Figure 5. Expression of Troponin protein isoforms in soleus (a), (b), (c), and Gastrocnemius muscles (d), (e), (f). * indicates significant change from control group ($P < .05$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

5. 근위축 관련 인자와 염증 관련 인자의 mRNA 발현량

본 연구에서 중력재부하와 저항성 운동이 회복에 미치는 영향을 비교하기 위하여 RT-PCR을 통해 근위축 관련 인자(Atrogin-1, Murf-1)와 염증성 인자(TNF- α , IL-6) mRNA 발현량을 분석하였다. 그 결과 SOL에서 근위축 관련 인자인 Atrogin-1의 mRNA level은 HRE, HEX 두 그룹 모두 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였으나 Murf-1의 mRNA level은 유의한 차이가 나타나지 않았다(Figure 6a). SOL에서 염증성 인자인 TNF- α 의 mRNA level은 CON 그룹에 비해 HRE 그룹에서 유의하게 증가하였으나 HEX 그룹에선 유의한 차이를 나타내지 않았다(Figure 6b). IL-6의 mRNA level은 CON 그룹에 비해 HEX 그룹에서 유의하게 증가하였으나 HRE 그룹에선 유의한 차이가 나타나지 않았다(Figure 6b).

GAS에서 Atrogin-1과 Murf-1 의 mRNA level은 HRE, HEX 두 그룹 모두 CON 그룹에 비해 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (Figure 6c). TNF- α 와 IL-6의 mRNA level은 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Figure 6d).

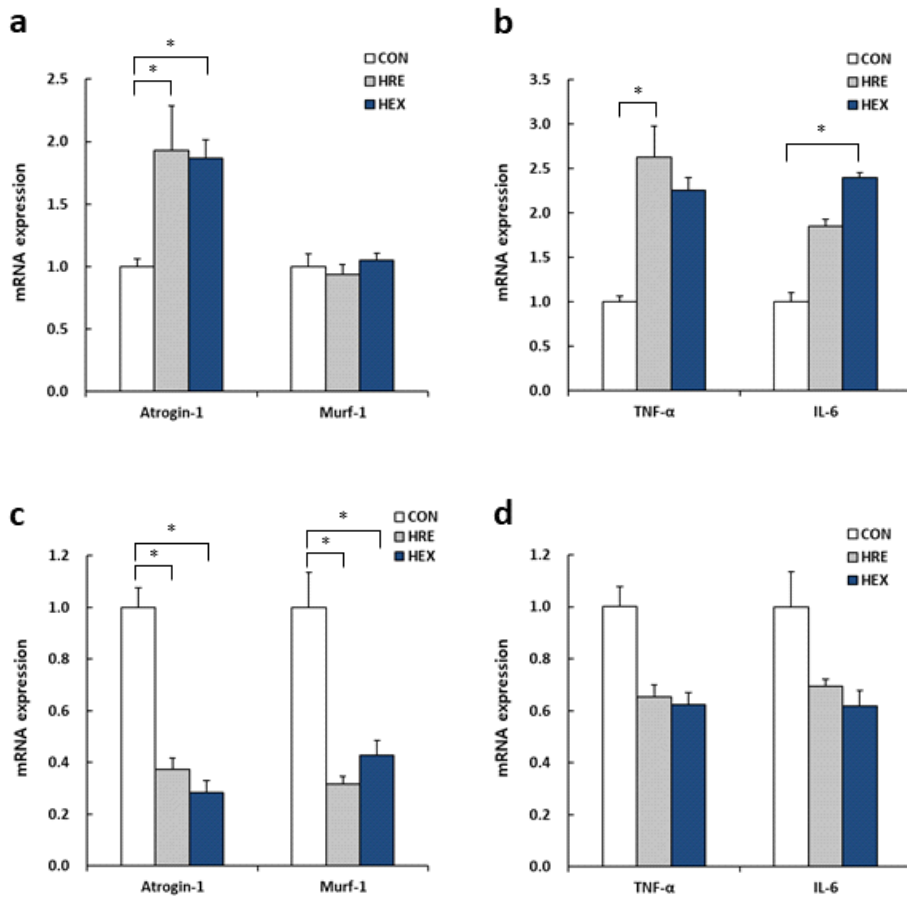


Figure 6. Expression of atrophy and inflammation relative markers mRNA level in soleus (a), (b) and Gastrocnemius muscles (c), (d). * indicates significant change from control group ($P < .05$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

6. HSP72 발현량

본 연구에서 4주간의 중력재부하와 저항성 운동이 근육에 따라 HSP72 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot과 RT-PCR을 통해 HSP72 단백질과 mRNA를 분석하였다. 4주간의 중력재부하(HRE)와 저항성 운동(HEX) 결과 SOL에서 HRE 그룹과 HEX 그룹의 HSP72 단백질 발현량이 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였다(Figure 7a, b). SOL에서 HSP72의 mRNA level 또한 HSP72 단백질 발현량과 유사하게 HRE 그룹과 HEX 그룹이 CON 그룹에 비해 유의하게 증가하였다(Figure 7e). 반면 GAS에서는 HSP72 단백질 발현량이 유의한 차이가 나타나지 않았다(Figure 7c, d). GAS에서 HSP72의 mRNA level은 HEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의하게 감소하였다(Figure 7f).

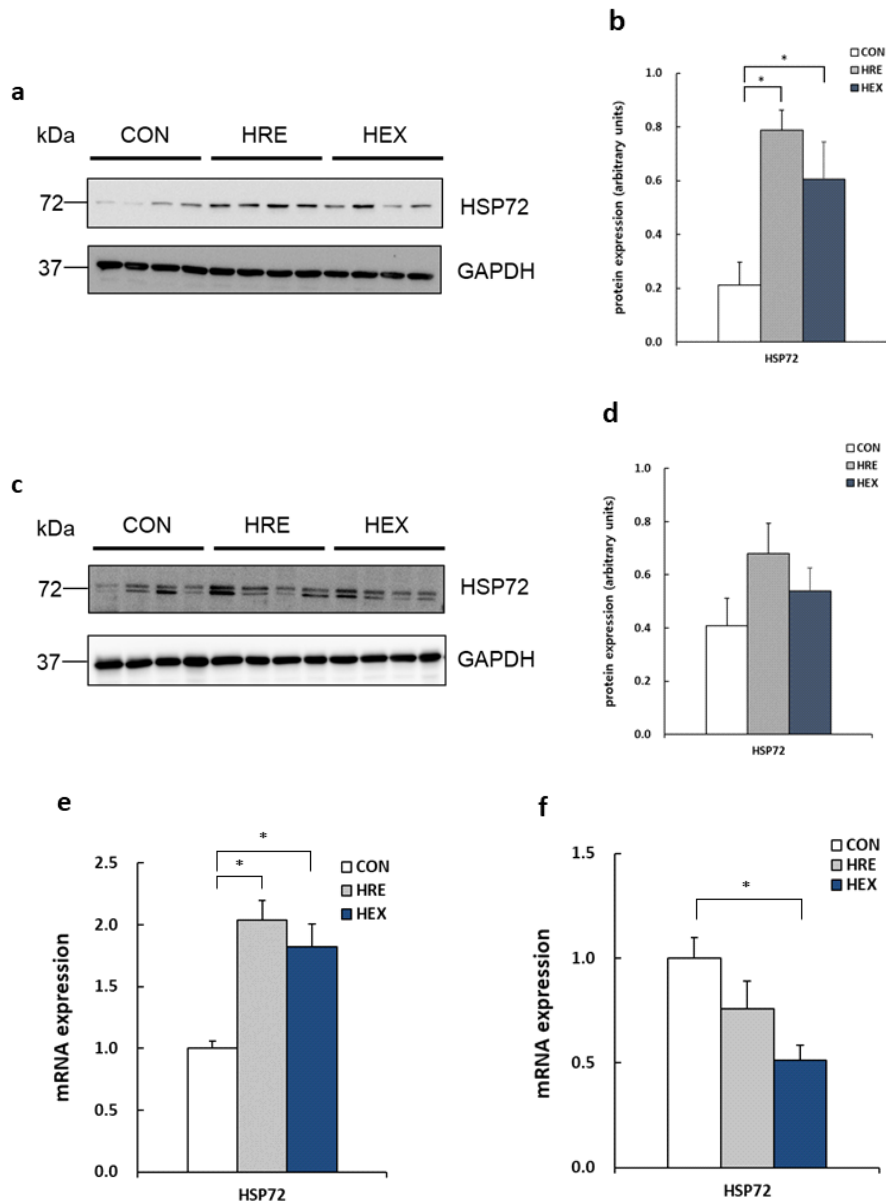


Figure 7. Expression of HSP72 protein and mRNA in soleus (a), (b), (e) and Gastrocnemius muscles (b), (c), (f). * indicates significant change from control group ($P < .05$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with mean comparison in Tukey's test.

V. 논 의

본 연구에서는 Sprague-Dawley rat을 대상으로 2주간의 뒷다리 부유(Hindlimb unloading)를 통해 근위축(Atrophy)을 유발하고, 4주간의 중력재부하(Reloading)와 저항성 사다리 운동을 실시하였다. 이를 통해 근섬유 형태가 다른 근육에 따라 근회복과 HSP72(Heat Shock Protein 72)의 발현량을 확인하고자 하였다. 대부분의 선행 연구에서는 중력재부하와 저항성 운동 각각의 중재를 통해 회복과 HSP72의 발현량을 비교하였으나 본 연구에서는 중력재부하와 저항성 사다리 운동 중재를 동시에 실시하여 근섬유 형태에 따라 그 효과를 비교하고 HSP72의 발현량을 확인하였다.

뒷다리 부유로 인한 근위축은 지근섬유에서 더 두드러지게 나타나므로 본 연구에서는 근섬유 형태에 따라 변화에 차이가 있을 것이라고 가설을 설정하였다. 근회복 정도와 HSP72 발현량을 근섬유 형태에 따라 비교하기 위해 약 90%가 지근섬유로 구성된 가자미근(Soleus, SOL)과 약 90% 이상이 속근섬유로 구성되어 있는 비복근(Gastrocnemius, GAS)을 분석하였다(Armstrong & Phelps, 1984; White et al., 2011).

본 연구에 앞서 뒷다리 부유(Hindlimb unloading)로 인한 근위축 효과를 확인하기 위해 2주간 뒷다리 부유를 실시한 결과 SOL과 GAS에서 모두 근육의 무게(Wet weight)가 유의하게 감소하였다(Figure 2). 이를 통해 2주간의 뒷다리 부유는 SOL과 GAS 두 근육 모두 근위축을 유발하는 것을 확인할 수 있다.

본 연구에서 2주간의 뒷다리 부유 후 회복 수준을 비교하기 위해 4주간의 중력재부하(HRE)와 저항성 운동 후(HEX) 근육별 무게를 비교하였다. 그 결과 중재를 실시한 두 그룹 모두 대조군과 비교하여 유의한 차이가 나타나지 않았으므로 4주간의 중력재부하와 저항성

운동은 근육의 무게를 정상으로 회복하는데 효과가 있는 것으로 볼 수 있다(Figure 3).

본 연구에서 2주간 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유발한 후 Grip strength 측정을 통해 근기능을 평가하였다. 그 결과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았지만 중재를 실시한 두 그룹의 Grip strength 평균값이 모두 약 100g이상 감소한 것으로 보아 근기능적으로 저하되었다고 할 수 있다(Figure 4, Table 4). 뒷다리 부유 후 4주간 실시한 중력재부하와 저항성 운동 각각의 처치가 근 기능적 회복에 차이가 있는지 확인하기 위해 Grip strength를 측정한 결과 근위축을 유발한 후 4주간 저항성 운동을 한 집단이 CON, HRE 그룹과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였다(Figure 4). 따라서 저항성 운동이 정상상태 이상으로 근기능을 향상시키는데 효과적인 것을 알 수 있다. 4주간 중력재부하를 실시한 HRE 그룹의 경우 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않는 것으로 보아 완전한 회복을 이루진 않았지만 근기능적으로 정상상태에 가깝게 회복이 이루어진 것을 알 수 있다(Figure 4, Table 4).

본 연구에서 중재 후 근섬유 형태 변화를 확인하기 위해 지근섬유와 속근섬유를 대변하는 단백질을 분석한 결과 SOL과 GAS에서 각각 다른 형태변화를 관찰하였다(Figure 5). 중력재부하를 시행한 그룹(HRE)의 속근섬유(Troponin I-FS)가 대조군과 저항성 운동을 시행한 그룹(HEX)과 비교하여 유의하게 높게 나타났다(Figure 5c). 약 90%가 지근섬유로 구성된 SOL에서 속근섬유가 증가하는 것은 뒷다리 부유 후 근위축이 나타나는 현상으로 잘 알려져 있다(Ishihara et al., 2004; Ohira, Kawano, Ohira, Goto, & Ohira, 2015). 따라서 본 연구 결과 HRE 그룹의 SOL에서 대조군, HEX 그룹과 비교하여 속근섬유(Troponin I-FS)가 증가한 것은 선행연구와 같이 근위축이 발생한 후 완전히 회복되지 않았음을 의미한다. 또한 운동중재를 통해 다시 정상과 같이 회복이 될 때 속근섬유의 비율이 감소하는 것으로 알려져 있다(Ohira, Kawano, Ohira, Goto, & Ohira, 2015). 본 연구 결과 SOL에서

HEX 그룹의 속근섬유가 HRE 그룹에 비해 유의하게 낮게 나타났으며 정상상태를 대변하는 CON 그룹과도 유의한 차이가 나지 않았으므로 뒷다리 부유를 통해 근위축을 유발한 뒤 운동 중재를 통해 HRE 그룹에 비해 회복된 것으로 볼 수 있다(Ishihara et al., 2004; Ohira, Kawano, Ohira, Goto, & Ohira, 2015).

본 연구에서 근위축시 증가하는 근위축 관련 인자와 염증관련 인자를 통해 회복의 정도를 중재별, 근육별로 비교하였다. HRE, HEX 두 그룹의 SOL에서 근위축 관련 인자인 Atrogin-1과 염증 관련 인자인 TNF- α , IL-6의 mRNA 발현량이 CON 그룹에 비해 유의하게 증가한 것으로 보아 아직 완전한 회복 상태에 이르지 못한 것으로 사료된다(Figure 6a, b). GAS의 경우 근위축 관련 인자인 Atrogin-1과 Murf-1 모두 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다(Figure 6c). 염증관련 인자인 TNF- α , IL-6는 대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타내진 않았지만 근위축 관련 인자와 함께 감소되는 경향을 나타낸 것을 보아 GAS에서는 SOL에 비하여 정상과 같이 회복에 이르렀다고 사료된다(Figure 6c, d). 하지만 mRNA level을 통하여 비교, 분석하였으므로 보다 정확한 판단을 위해 추후 연구에서 단백질 수준에서의 분석이 필요하다.

근회복과 관련하여 Grip strength, Troponin protein, Inflammation marker, Atrophy marker의 종합적인 확인을 통해 저항성 사다리 운동이 HRE에 비해 더 빠른 회복을 유도하는 것을 확인하였다. 반면 HEX그룹에 비해 HRE 그룹의 SOL에서 정상과 같이 완전한 회복을 이루지 못하고 근손상(Muscle damage)이 남아있는 것으로 판단된다.

HSP72는 고열, 고체온, 세포 손상 등 다양한 스트레스에 대항하여 세포를 보호하는 물질로 운동이 HSP72의 발현을 유도한다고 보고되고 있다(Snoeckx, Cornelussen, Van Nieuwenhoven, Reneman, & Van der Vusse, 2001; Murlasits et al., 2006; Locke, Noble, & Atkinson, 1990; Salo, Donovan, & Davies, 1991). 운동을 하면 근육에 열이 발생하고 사람과 쥐 모두 HSP72의 발현이 증가한다. 선행 연구에서 9주간 뒷다리

부유를 통해 근 위축을 유발하고 2주, 4주, 8주간 중력재부하를 실시하여 각각의 시점의 SOL에서 HSP72의 발현량을 확인한 결과 2주, 4주 동안 중력재부하를 실시한 그룹에서 유의하게 증가하는 것을 확인 하였다(Y Oishi et al., 2003). 이와는 반대로 뒷다리 부유 후 3일, 7일 14일의 중력재부하를 실시하였을 때 7일에 HSP72의 발현이 증가하였다가 14일부터 정상상태로 돌아온 결과가 나타났다(Y Oishi et al., 2008). 사람을 대상으로 한 연구에서 혈중 HSP72의 발현량은 60분간 트레드밀 운동 직후 가장 높게 증가 되었으며 8시간 후에 정상상태와 같이 돌아온 것을 확인하였다. 또한 대퇴부의 외측광근(Vastus lateralis)에서 HSP72의 mRNA 발현량이 2시간 후 가장 높게 발현되었으며 24시간 뒤엔 정상상태에 가깝게 돌아온 것을 확인하였다(Konopka et al., 2010). HSP72의 단백질 수준의 변화는 개체 간 차이가 존재하였지만 유의성이 나타나는 개체에서는 mRNA 발현 양상과 유사하게 운동 후 2시간 뒤 가장 높게 나타났으며 24시간 뒤에는 발현량이 정상과 같았다(Walsh et al., 2001). 따라서 본 연구에서 실시한 4주간의 중재는 분자생물학적인 적응(Adaptation)으로 인하여 SOL와 GAS에서 변화의 차이를 명확하게 관찰하기에는 오랜 기간으로 사료되므로 추후 연구에서는 변화를 확인할 수 있는 중재 기간과 시점을 설정하여 관찰 필요가 있다.

HSP72는 스트레스가 없는 정상상태에서 지근섬유에 많이 함유되어 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Locke, Atkinson, Tanguay, & Noble, 1994; Locke, Noble, & Atkinson, 1991). 단발적인 운동 후 사람의 대퇴근에서 시간에 따라 HSP70의 발현을 확인한 결과 속근섬유에 비해 지근섬유에서 크게 증가하는 것으로 나타났다(Tupling, Bombardier, Stewart, Vigna, & Aqui, 2007). 따라서 이는 본 연구에서 HSP72 발현의 유의미한 차이를 나타내는 양상이 근육에 따라 다르게 나타나는 것의 원인 중 하나로 사료된다(Figure 7).

HSP72와 분자적 구조와 특성이 유사한 HSP70은 면역세포에 사이토카인(Cytokine) 생산을 자극하는 것으로 알려져 있다(Asea et al., 2000; Multhoff et al., 1999). HSP70가 원형질막(Plasma membrane)에

존재하는 단백질과 결합하여 단핵구(Monocyte)에서 염증성 인자(Pro-inflammatory cytokine)인 TNF- α 와 IL-1 β , IL-6의 발현량을 증가시킨다(Asea et al., 2000; Multhoff et al., 1999). 사람을 대상으로 한 연구에서 9주간 운동 후 Quadriceps에서 염증 관련 인자를 확인한 결과 유의한 차이가 나타나지 않았지만 감소되는 경향을 보였으며 HSP70의 mRNA 발현량은 유의하게 감소된 것을 확인하였다(Konopka et al., 2010). 사람을 대상으로 한 또 다른 선행 연구에서 60분의 트레드밀 운동 후 근손상 지표로서 사람의 혈중 CK(Creatine Kinase)를 확인한 결과 혈중 CK 발현량과 유사하게 HSP72의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Walsh et al., 2001). 따라서 본 연구의 SOL에서 염증관련 인자의 증가와 함께 HSP72 발현량 변화 양상이 나타난 것으로 사료된다(Figure 7b). 하지만 본 연구에서는 현상만을 관찰하여 회복과 직접적인 관계를 증명하지 못하였으므로 추후 연구에서는 회복에 직접적인 관계를 규명할 수 있도록 추가적인 실험이 필요하다.

참 고 문 헌

- Adams, G. R., Cheng, D. C., Haddad, F., & Baldwin, K. M. (2004). Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. *Journal of Applied Physiology*, *96*(5), 1613–1618. doi: 10.1152/japplphysiol.01162.2003
- Adams, G. R., Haddad, F., Bodell, P. W., Tran, P. D., & Baldwin, K. M. (2007). Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. *Journal of Applied Physiology*, *103*(5), 1644–1654. doi: 10.1152/japplphysiol.00669.2007
- Akima, H., Kawakami, Y., Kubo, K., Sekiguchi, C., Ohshima, H., Miyamoto, A., & Fukunaga, T. (2000). Effect of short-duration spaceflight on thigh and leg muscle volume. *Medicine and science in sports and exercise*, *32*(10), 1743–1747. doi: 10.1097/00005768-200010000-00013
- Appell, H., Duarte, J., & Soares, J. (1990). Muscle atrophy following immobilization. *Sports medicine*, 42–58. doi: 10.2165/00007256-199010010-00005
- Aragno, M., Mastrocola, R., Catalano, M. G., Brignardello, E., Danni, O., & Boccuzzi, G. (2004). Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats. *Diabetes*, *53*(4), 1082–1088. doi: 10.2337/diabetes.53.4.1082
- Armstrong, R., & Phelps, R. (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Developmental dynamics*, *171*(3), 259–272. doi: 10.1002/aja.1001710303
- Armstrong, R., Warren, G., & Warren, J. (1991). Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports medicine*, *12*(3),

- 184–207. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Gordon_Warren/publication/21370678_Mechanisms_of_Exercise-Induced_Muscle_Fibre_Injury/links/00b7d5217ec32addb2000000.pdf
- Asea, A., Kraeft, S.-K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., . . . Calderwood, S. K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature medicine*, 6(4), 435–442. doi: 10.1038/74697
- Baldwin, K., Valdez, V., Herrick, R., MacIntosh, A., & Roy, R. (1982). Biochemical properties of overloaded fast-twitch skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 52(2), 467–472. doi: 10.1152/jappl.1982.52.2.467
- Benjamin, I. J., Shelton, J., Garry, D. J., & Richardson, J. A. (1997). Temporospatial expression of the small HSP/αB crystallin in cardiac and skeletal muscle during mouse development. *Developmental dynamics*, 208(1), 75–84. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199701)208:1<75::AID-AJA7>3.0.CO;2-Z
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., . . . Glass, D. J. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology*, 3(11), 1014–1019. doi: 10.1038/ncb1101-1014
- D'Aunno, D. S., Thomason, D. B., & Booth, F. W. (1990). Centrifugal intensity and duration as countermeasures to soleus muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 69(4), 1387–1389. doi: 10.1152/jappl.1990.69.4.1387
- Darr, K. C., & Schultz, E. (1989). Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *Journal of Applied Physiology*, 67(5), 1827–1834. doi:

10.1152/jappl.1989.67.5.1827

- Duncan, N. D., Williams, D. A., & Lynch, G. S. (1998). Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 77(4), 372-378. doi: 10.1007/s004210050347
- Dupont-Versteegden, E. E., Fluckey, J. D., Knox, M., Gaddy, D., & Peterson, C. A. (2006). Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. *Journal of Applied Physiology*, 101(1), 202-212. doi: 10.1152/japplphysiol.01540.2005
- Edgerton, V. R., & Roy, R. R. (1994). Neuromuscular adaptation to actual and simulated weightlessness. *Advances in space biology and medicine*, 4, 33-67. doi: 10.1002/cphy.cp040132
- Esser, K. (2008). Regulation of mTOR signaling in skeletal muscle hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 8(4), 338-339.
- Fargnoli, J., Kunisada, T., Fornace, A. J., Schneider, E. L., & Holbrook, N. J. (1990). Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(2), 846-850. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/87/2/846.long>
- Febbraio, M., & Koukoulas, I. (2000). HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *Journal of Applied Physiology*, 89(3), 1055-1060. doi: 10.1152/jappl.2000.89.3.1055
- Fitts, R. H., Metzger, J. M., Riley, D. A., & Unsworth, B. (1986). Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *Journal of Applied Physiology*, 60(6),

- 1946–1953. doi: 10.1152/jappl.1986.60.6.1946
- Fry, A. C. (2004). The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports medicine*, 34(10), 663–679. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/18d6/c4e216c5c8de5cada5d3f8630aba61b05af5.pdf>
- Fujino, H., Ishihara, A., Murakami, S., Yasuhara, T., Kondo, H., Mohri, S., . . . Roy, R. (2009). Protective effects of exercise preconditioning on hindlimb unloading induced atrophy of rat soleus muscle. *Acta Physiologica*, 197(1), 65–74. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01984.x
- Fujino, H., Ishihara, A., Murakami, S., Yasuhara, T., Kondo, H., Mohri, S., . . . Roy, R. R. (2009). Protective effects of exercise preconditioning on hindlimb unloading-induced atrophy of rat soleus muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, 197(1), 65–74. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01984.x
- Garramone Jr, R. R., Winters, R. M., Das, D. K., & Deckers, P. J. (1994). Reduction of skeletal muscle injury through stress conditioning using the heat-shock response. *Plastic and reconstructive surgery*, 93(6), 1242–1247. Retrieved from http://journals.lww.com/plasreconsurg/Abstract/1994/05000/Reduction_of_Skeletal_Muscle_Injury_Through_Stress.21.aspx
- Goldberg, A. L. (1968). Protein synthesis during work-induced growth of skeletal muscle. *The Journal of cell biology*, 36(3), 653. Retrieved from <http://jcb.rupress.org/content/jcb/36/3/653.full.pdf>
- Golenhofen, N., Ness, W., Koob, R., Htun, P., Schaper, W., & Drenckhahn, D. (1998). Ischemia-induced phosphorylation and translocation of stress protein α B-crystallin to Z lines of myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 274(5), H1457–H1464. doi:

10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1457

- Grosset, J. F., & Onambele Pearson, G. (2008). Effect of foot and ankle immobilization on leg and thigh muscles' volume and morphology: A case study using magnetic resonance imaging. *The Anatomical Record*, 291(12), 1673–1683. doi: 10.1002/ar.20759
- Hanson, A. M., Stodieck, L. S., Cannon, C. M., Simske, S. J., & Ferguson, V. L. (2010). Seven days of muscle re-loading and voluntary wheel running following hindlimb suspension in mice restores running performance, muscle morphology and metrics of fatigue but not muscle strength. *Journal of muscle research and cell motility*, 31(2), 141–153. doi: 10.1007/s10974-010-9218-5
- Hather, B., Tesch, P., Buchanan, P., & Dudley, G. (1991). Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. *Acta Physiologica*, 143(2), 177–185. doi: 10.1111/j.1748-1716.1991.tb09219.x
- Herbert, M., Roy, R., & Edgerton, V. (1988). Influence of one-week hindlimb suspension and intermittent high load exercise on rat muscles. *Experimental neurology*, 102(2), 190–198. doi: 10.1016/0014-4886(88)90093-3
- Heydari, A., Takahashi, R., Gutschmann, A., You, S., & Richardson, A. (1994). Hsp70 and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 50(11), 1092–1098. Retrieved from http://libproxy.snu.ac.kr/a64da1d/_Lib_Proxy_Url_Https/link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F01923466.pdf
- Hornberger Jr, T. A., & Farrar, R. P. (2004). Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian journal of*

- applied physiology*, 29(1), 16–31. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Troy_Hornberger/publication/n/8463637_Physiological_Hypertrophy_of_the_FHL_Muscle_Following_8_Weeks_of_Progressive_Resistance_Exercise_in_the_Rat/links/02e7e5207d1c087a7e000000.pdf
- Hurst, J. E., & Fitts, R. H. (2003). Hindlimb unloading-induced muscle atrophy and loss of function: protective effect of isometric exercise. *Journal of Applied Physiology*, 95(4), 1405–1417. doi: 10.1152/japplphysiol.00516.2002
- Ishihara, A., Kawano, F., Ishioka, N., Oishi, H., Higashibata, A., Shimazu, T., & Ohira, Y. (2004). Effects of running exercise during recovery from hindlimb unloading on soleus muscle fibers and their spinal motoneurons in rats. *Neuroscience research*, 48(2), 119–127. doi: 10.1016/j.neures.2003.10.013
- Jung, S., Ahn, N., Kim, S., Byun, J., Joo, Y., Kim, S., . . . Kim, K. (2015). The effect of ladder-climbing exercise on atrophy/hypertrophy-related myokine expression in middle-aged male Wistar rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 65(6), 515–521. doi: 10.1007/s12576-015-0388-1
- Kilgore, J. L., Musch, T. I., & Ross, C. R. (1998). Physical activity, muscle, and the HSP70 response. *Canadian journal of applied physiology*, 23(3), 245–260. doi: 10.1139/h98-013
- Kirby, C. R., Ryan, M. J., & Booth, F. W. (1992). Eccentric exercise training as a countermeasure to non-weight-bearing soleus muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 73(5), 1894–1899. doi: 10.1152/jappl.1992.73.5.1894
- Knowlton, A. A. (1995). The role of heat shock proteins in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 27(1), 121–131. doi: 10.1016/S0022-2828(08)80012-0

- Konopka, A. R., Douglass, M. D., Kaminsky, L. A., Jemiolo, B., Trappe, T. A., Trappe, S., & Harber, M. P. (2010). Molecular adaptations to aerobic exercise training in skeletal muscle of older women. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 65(11), 1201–1207. doi: 10.1093/gerona/glq109
- Ku, Z., Yang, J., Menon, V., & Thomason, D. (1995). Decreased polysomal HSP-70 may slow polypeptide elongation during skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 268(6), C1369–C1374. doi: 10.1152/ajpcell.1995.268.6.C1369
- LeBlanc, A., Lin, C., Shackelford, L., Sinitsyn, V., Evans, H., Belichenko, O., . . . Bakulin, A. (2000). Muscle volume, MRI relaxation times (T2), and body composition after spaceflight. *Journal of Applied Physiology*, 89(6), 2158–2164. doi: 10.1152/jappl.2000.89.6.2158
- Leonard, J. I., Leach, C. S., & Rambaut, P. C. (1983). Quantitation of tissue loss during prolonged space flight. *The American journal of clinical nutrition*, 38(5), 667–679. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/38/5/667.short>
- Leterme, D., & Falempin, M. (1994). Compensatory effects of chronic electrostimulation on unweighted rat soleus muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 426(1), 155–160. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007%2F00374683?LI=true>
- Liu, A.-C., Lee, Y.-K., Manalo, D., & Huang, L. E. (1996). Attenuated heat shock transcriptional response in aging: molecular mechanism and implication in the biology of aging. *In Stress-inducible cellular responses* (pp. 393–408): Springer.

- Retrieved from
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-9088-5_26
- Liu, Y., & Steinacker, J. M. (2001). Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci*, 6(D12-25), D12-D25. Retrieved from
<https://www.bioscience.org/2001/v6/d/liu/fulltext.htm>
- Locke, M. (1997). 5 The Cellular Stress Response to Exercise: Role of Stress Proteins. *Exercise and sport sciences reviews*, 25(1), 105-136. Retrieved from
http://journals.lww.com/acsm-essr/Citation/1997/00250/5_The_Cellular_Stress_Response_to_Exercise__Role.7.aspx
- Locke, M. (2000). Heat shock transcription factor activation and hsp72 accumulation in aged skeletal muscle. *Cell stress & chaperones*, 5(1), 45-51. doi: 10.1043/1355-8145(2000)005<0045:HSTFAA>2.0.CO;2
- Locke, M., Atkinson, B. G., Tanguay, R. M., & Noble, E. G. (1994). Shifts in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 266(5), C1240-C1246. doi: 10.1152/ajpcell.1994.266.5.C1240
- Locke, M., Noble, E. G., & Atkinson, B. G. (1990). Exercising mammals synthesize stress proteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 258(4), C723-C729. doi: 10.1152/ajpcell.1990.258.4.C723
- Locke, M., Noble, E. G., & Atkinson, B. G. (1991). Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 261(5), C774-C779. doi: 10.1152/ajpcell.1991.261.5.C774

- Maki, T., Yamamoto, D., Nakanishi, S., Iida, K., Iguchi, G., Takahashi, Y., . . . Okimura, Y. (2012). Branched-chain amino acids reduce hindlimb suspension-induced muscle atrophy and protein levels of atrogen-1 and MuRF1 in rats. *Nutrition Research*, 32(9), 676–683. doi: 10.1016/j.nutres.2012.07.005
- McArdle, A., Dillmann, W. H., Mestril, R., Faulkner, J. A., & Jackson, M. J. (2004). Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *The FASEB journal*, 18(2), 355–357. doi: 10.1096/fj.03-0395fje
- Morey-Holton, E., & Wronski, T. (1982). Animal models for simulating weightlessness.
- Multhoff, G., Mizzen, L., Winchester, C. C., Milner, C. M., Wenk, S., Eissner, G., . . . Johnson, J. (1999). Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Experimental hematology*, 27(11), 1627–1636. doi: 10.1016/S0301-472X(99)00104-6
- Murlasits, Z., Cutlip, R. G., Geronilla, K. B., Rao, K. M. K., Wonderlin, W. F., & Alway, S. E. (2006). Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. *Experimental gerontology*, 41(4), 398–406. doi: 10.1016/j.exger.2006.01.005
- Musacchia, X., & Fagette, S. (1997). Weightlessness simulations for cardiovascular and muscle systems: validity of rat models. *Journal of gravitational physiology: a journal of the International Society for Gravitational Physiology*, 4(3), 49–59. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/11541869>
- Naito, H., Powers, S. K., Demirel, H. A., & Aoki, J. (2001). Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old

- rats. *Medicine and science in sports and exercise*, 33(5), 729-734. doi: 10.1097/00005768-200105000-00008
- Naito, H., Powers, S. K., Demirel, H. A., Sugiura, T., Dodd, S. L., & Aoki, J. (2000). Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *Journal of Applied Physiology*, 88(1), 359-363. doi: 10.1152/jappl.2000.88.1.359
- Neufer, P. D., Ordway, G. A., Hand, G. A., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Benjamin, I. J., & Williams, R. S. (1996). Continuous contractile activity induces fiber type specific expression of HSP70 in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(6), C1828-C1837.
- Ohira, T., Kawano, F., Ohira, T., Goto, K., & Ohira, Y. (2015). Responses of skeletal muscles to gravitational unloading and/or reloading. *The Journal of Physiological Sciences*, 65(4), 293-310. doi: 10.1007/s12576-015-0375-6
- Ohira, T., Terada, M., Kawano, F., Nakai, N., Ogura, A., & Ohira, Y. (2011). Region-specific responses of adductor longus muscle to gravitational load-dependent activity in Wistar Hannover rats. *PLoS One*, 6(6), e21044. doi: 10.1371/journal.pone.0021044
- Ohira, Y., Jiang, B., Roy, R. R., Oganov, V., Ilyina-Kakueva, E., Marini, J., & Edgerton, V. (1992). Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology*, 73(2), S51-S57. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1388148>
- Ohira, Y., Yoshinaga, T., Nonaka, I., Ohara, M., Yoshioka, T., Yamashita-Goto, K., . . . Shenkman, B. S. (2000). Histochemical responses of human soleus muscle fibers to long-term bedrest with or without countermeasures. *The Japanese journal of physiology*, 50(1), 41-47. doi:

10.2170/jjphysiol.50.41

- Ohira, Y., Yoshinaga, T., Ohara, M., Nonaka, I., Yoshioka, T., Yamashita-Goto, K., . . . Edgerton, V. (1999). Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without loading. *Journal of Applied Physiology*, 87(5), 1776–1785. doi: 10.1152/jappl.1999.87.5.1776
- Oishi, Y., Ogata, T., Yamamoto, K. i., Terada, M., Ohira, T., Ohira, Y., . . . Roy, R. (2008). Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiologica*, 192(3), 381–395. doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01747.x
- Oishi, Y., Taniguchi, K., Matsumoto, H., Kawano, F., Ishihara, A., & Ohira, Y. (2003). Upregulation of HSP72 in reloading rat soleus muscle after prolonged hindlimb unloading. *Jpn J Physiol*, 53(4), 281–286. doi: 10.2170/jjphysiol.53.281
- Oishi, Y., Taniguchi, K., Matsumoto, H., Kawano, F., Ishihara, A., & Ohira, Y. (2003). Upregulation of HSP72 in reloading rat soleus muscle after prolonged hindlimb unloading. *The Japanese journal of physiology*, 53(4), 281–286. doi: 10.2170/jjphysiol.53.281
- Powers, S. K., Quindry, J., & Hamilton, K. (2004). Aging, exercise, and cardioprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019(1), 462–470. doi: 10.1196/annals.1297.084
- Rittweger, J., Frost, H. M., Schiessl, H., Ohshima, H., Alkner, B., Tesch, P., & Felsenberg, D. (2005). Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study. *Bone*, 36(6), 1019–1029. doi: 10.1016/j.bone.2004.11.014
- Salo, D. C., Donovan, C. M., & Davies, K. J. (1991). HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in

- skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(3), 239–246. doi: 10.1016/0891-5849(91)90119-N
- Seo, D. Y., Lee, S. R., Kim, N., Ko, K. S., Rhee, B. D., & Han, J. (2014). Humanized animal exercise model for clinical implication. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 466(9), 1673–1687. doi: 10.1007/s00424-014-1496-0
- Seward, D. J., Haney, J. C., Rudnicki, M. A., & Swoap, S. J. (2001). bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(2), C408–C413. doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.2.C408
- Snoeckx, L. H., Cornelussen, R. N., Van Nieuwenhoven, F. A., Reneman, R. S., & Van der Vusse, G. J. (2001). Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiological Reviews*, 81(4), 1461–1497. doi: 10.1152/physrev.2001.81.4.1461
- Talmadge, R. J. (2000). Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle & nerve*, 23(5), 661–679. doi: 10.1002/(SICI)1097-4598(200005)23:5<661::AID-MUS3>3.0.CO;2-J
- Tesch, P., Ekberg, A., Lindquist, D., & Trieschmann, J. (2004). Muscle hypertrophy following 5 week resistance training using a non gravity dependent exercise system. *Acta Physiologica Scandinavica*, 180(1), 89–98. doi: 10.1046/j.0001-6772.2003.01225.x
- Thomason, D., Herrick, R., Surdyka, D., & Baldwin, K. (1987). Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *Journal of Applied Physiology*, 63(1), 130–137. doi: 10.1152/jappl.1987.63.1.130

- Thomason, D. B., & Booth, F. W. (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *Journal of Applied Physiology*, 68(1), 1–12. doi: 10.1152/jappl.1990.68.1.1
- Trappe, S., Creer, A., Minchev, K., Slivka, D., Louis, E., Luden, N., & Trappe, T. (2008). Human soleus single muscle fiber function with exercise or nutrition countermeasures during 60 days of bed rest. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(3), R939–R947. doi: 10.1152/ajpregu.00761.2007
- Trappe, S., Creer, A., Slivka, D., Minchev, K., & Trappe, T. (2007). Single muscle fiber function with concurrent exercise or nutrition countermeasures during 60 days of bed rest in women. *Journal of Applied Physiology*, 103(4), 1242–1250. doi: 10.1152/japplphysiol.00560.2007
- Tsika, R., Herrick, R., & Baldwin, K. (1987). Interaction of compensatory overload and hindlimb suspension on myosin isoform expression. *Journal of Applied Physiology*, 62(6), 2180–2186. doi: 10.1152/jappl.1987.62.6.2180
- Tupling, A. R., Bombardier, E., Stewart, R., Vigna, C., & Aquil, A. E. (2007). Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise. *Journal of Applied Physiology*, 103(6), 2105–2111. doi: 10.1152/japplphysiol.00771.2007
- Vandenburgh, H., & Kaufman, S. (1979). In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science*, 203(4377), 265–268. doi: 10.1126/science.569901
- Vermaelen, M., Marini, J. F., Chopard, A., Benyamin, Y., Mercier, J., & Astier, C. (2005). Ubiquitin targeting of rat muscle proteins during short periods of unloading. *Acta Physiologica*, 185(1),

33-40. doi: 10.1111/j.1365-201X.2005.01446.x

- Walsh, R., Koukoulas, I., Garnham, A., Moseley, P., Hargreaves, M., & Febbraio, M. (2001). Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell stress & chaperones*, 6(4), 386-393. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC434422/pdf/i1466-1268-6-4-386.pdf>
- Wang, X., Kawano, F., Matsuoka, Y., Fukunaga, K., Terada, M., Sudoh, M., . . . Ohira, Y. (2006). Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(4), C981-C989. doi: 10.1152/ajpcell.00298.2005
- Welch, W. J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*, 72(4), 1063-1081. doi: 10.1152/physrev.1992.72.4.1063
- White, J. P., Baltgalvis, K. A., Puppa, M. J., Sato, S., Baynes, J. W., & Carson, J. A. (2011). Muscle oxidative capacity during IL-6-dependent cancer cachexia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(2), R201-R211. doi: 10.1152/ajpregu.00300.2010
- Widrick, J. J., Knuth, S. T., Norenberg, K. M., Romatowski, J., Bain, J. L., Riley, D. A., . . . Costill, D. (1999). Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. *J Physiol*, 516(3), 915-930. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0915u.x
- Widrick, J. J., Knuth, S. T., Norenberg, K. M., Romatowski, J. G., Bain, J. L., Riley, D. A., . . . Fitts, R. H. (1999). Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus

muscle fibres. *J Physiol*, 516(Pt 3), 915–930. doi:
10.1111/j.1469-7793.1999.0915u.x

Yamashita-Goto, K., Okuyama, R., Honda, M., Kawasaki, K., Fujita, K., Yamada, T., . . . Yoshioka, T. (2001). Maximal and submaximal forces of slow fibers in human soleus after bed rest. *Journal of Applied Physiology*, 91(1), 417–424. doi:
10.1152/jappl.2001.91.1.417

Zange, J., Müller, K., Schuber, M., Wackerhage, H., Hoffmann, U., Günther, R., . . . Bacharev, A. (1997). Changes in calf muscle performance, energy metabolism, and muscle volume caused by long term stay on space station MIR. *International journal of sports medicine*, 18(S 4), S308–S309. doi:
10.1055/s-2007-972738

Abstract

The Effect of Resistance Ladder Climbing Exercise on Muscle Recovery and Heat Shock Protein 72 Expression after Hindlimb Unloading in Rat

Hoyoun Kim

Health and Exercise Science

Department of Physical Education

The Graduate School

Seoul National University

Introduction : It is important to recover effectively from skeletal muscle atrophy. Therefore, it has been widely studied to promote effective recovery from atrophy induced by disuse. Hindlimb unloading in rats is a model that reproduces muscle atrophy in animals due to muscle disuse. The resistance ladder climbing exercise is the most effective way to induce muscle hypertrophy against muscle atrophy by short-term training. In this study, muscle recovery and HSP72 expression levels were compared in muscle by muscle gravity reloading and resistance exercise for 4 weeks in the Sprague-Dawley rats.

Method : 9-week-old male Sprague-Dawley rats were divided into following groups; control group(CON), reloading after hindlimb unloading group(HRE), and resistance ladder climbing exercise group after hindlimb unloading group(HEX). In order to confirm the recovery effect by muscle fiber type, gravity reloading and resistive ladder exercise were performed for 4 weeks. Muscle wet weight was measured by phenotypic analysis of Soleus and Gastrocnemius. Troponin I-SS, Troponin I-FS, atrophy-related factors(Atrogin-1, Murf-1), inflammation-related factors(TNF- α , IL-6), and mRNA and protein levels of HSP72 were analyzed by real-time PCR and western blot analysis. All data were analyzed by using SPSS 22.0 statistical program. The descriptive statistics were used to determine the mean and standard error for each item, and an independent t-test and one-way ANOVA were conducted to verify the difference between groups. All statistical significance levels were set at $P < .05$.

Results : Muscle wet weight was decreased significantly in Soleus and Gastrocnemius after 2 week Hindlimb unloading. The grip strength of the 4 week resistance ladder climbing exercise(HEX) group was significantly higher than that of the two groups. Analysis of Troponin I-SS and Troponin I-FS proteins in Soleus and Gastrocnemius showed that Troponin I-FS was significantly increased only in the soleus HRE group. Atrogin-1 mRNA levels of Soleus were significantly increased in the HRE and HEX groups compared to the CON group. TNF- α was significantly increased in the HRE group and IL-6 was significantly increased in the HEX group. The mRNA levels of Atrogin-1 and Murf-1 of Gastrocnemius were significantly lower in the intervention group than in the CON group. The expression

level of HSP72 was significantly increased in Soleus compared to CON group in both HRE and HEX groups.

Conclusion : Although gravity reloading and resistance ladder climbing exercises had positive effects on muscle recovery, there was no significant difference between the interventions at the molecular level. Further studies on mechanism is required and at the same time, we recommend to apply the appropriate intervention period to identify differences in muscle recovery and HSP72 expression levels.

Keywords : Hindlimb unloading, Reloading, Atrophy, Resistance exercise, Muscle recovery, HSP72

Student Number : 2016-21623